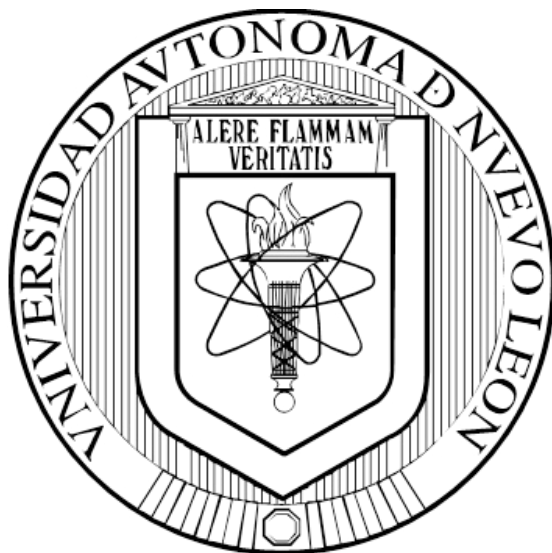


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS

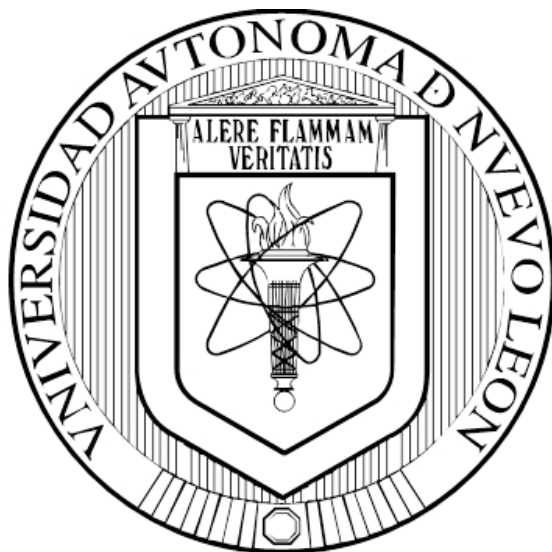
**BIOTRANSFORMACIÓN REDUCTIVA DE COLORANTES AZO
UTILIZANDO UN CONSORCIO ANAEROBIO ENRIQUECIDO Y
MEDIADORES REDOX INMOVILIZADOS EN CARBÓN ACTIVADO**

**PRESENTA
YAÍR ADÁN DEL ANGEL ACOSTA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

Mayo 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TESIS

**BIOTRANSFORMACIÓN REDUCTIVA DE COLORANTES AZO
UTILIZANDO UN CONSORCIO ANAEROBIO ENRIQUECIDO Y
MEDIADORES REDOX INMOVILIZADOS EN CARBÓN ACTIVADO**

**PRESENTA
YAÍR ADÁN DEL ANGEL ACOSTA**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

Mayo 2016

**BIOTRANSFORMACIÓN REDUCTIVA DE COLORANTES AZO UTILIZANDO
UN CONSORCIO ANAEROBIO ENRIQUECIDO Y MEDIADORES REDOX
INMOVILIZADOS EN CARBÓN ACTIVADO**



Comité de Tesis

Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia
Director Interno

Dr. Refugio Bernardo García Reyes
Co-Director

Dra. María Teresa Garza González
Tutor

Dr. Ulrico Javier López Chuken
Tutor

Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu
Tutor

Mayo del 2016.

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia, y el soporte económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT beca # 266129) y del Programa para el Desarrollo Profesional Docente (N-PTC 2015).

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres Constantino Del Angel Vargas e Idalia Acosta Villanueva.

A mis hermanos Yael Alejandro Del Angel Acosta y Yassel Ali Del Angel Acosta.

A mi esposa Luz Elena Cortés Zapata.

Por amor a ellos vale la pena mejorar cada día.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su constante apoyo y motivación a lo largo de toda esta travesía.

A mi esposa Luz Elena Cortés Zapata por su constante apoyo, motivación, amor, paciencia y compañía a lo largo de todo el proyecto.

A mis compañeros de generación por su apoyo moral y compañía durante estos dos años de investigación.

A mi Co-director de tesis, el Dr. Refugio Bernardo García Reyes por sus consejos, apoyo y ánimos durante todo el proyecto.

Y finalmente un especial agradecimiento a mi Director de tesis el Dr. Luis Humberto Álvarez Valencia por su gran apoyo al abordar este desafío, por su permanente contribución en cada etapa del trabajo, por su dedicación y aporte intelectual, y por el ejemplo brindado ante cada uno de los requerimientos planteados en esta investigación.

RESUMEN

Yair Adan Del Angel Acosta

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título de tesis: BIOTRANSFORMACIÓN REDUCTIVA DE COLORANTES AZO UTILIZANDO UN CONSORCIO ANAEROBIO ENRIQUECIDO Y MEDIADORES REDOX INMOVILIZADOS EN CARBÓN ACTIVADO.

Número de páginas: 62

Candidato de la Maestría en Ciencias
con Orientación en Microbiología Aplicada

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Propósito y métodos del estudio: Actualmente la contaminación del agua con colorantes del tipo azo, liberados en los efluentes textiles, representa una amenaza para el medio ambiente y para la salud humana. De los tratamientos desarrollados hasta ahora, la digestión anaerobia representa una estrategia adecuada en términos de sustentabilidad. En este trabajo se utilizó un consorcio anaerobio especializado capaz de utilizar el humus como mediador redox (MR) durante la decoloración de colorantes tipo azo. El consorcio anaerobio especializado se enriqueció mediante la adición de un MR, promoviendo así el establecimiento selectivo de microorganismos reductores de humus en el consorcio original. Adicionalmente, se inmovilizó el MR en carbón activado (CA) para evitar la adición continua del MR durante el proceso de decoloración.

Contribución y conclusiones: Al utilizar la biomasa enriquecida y MR inmovilizados (MR_{imm}) en CA se lograron obtener eficiencias de decoloración de hasta 98.06%, con altas velocidades de decoloración de $0.244\ h^{-1}$, comparado con el 7 % de decoloración y una baja velocidad de decoloración ($0.017\ h^{-1}$) obtenido por una biomasa no enriquecida y en ausencia de MR. Sin embargo, este MR_{imm} no puede ser usado en la biotransformación de todos los colorantes, ya que algunos de estos liberan aminas aromáticas como productos de su biotransformación (PB) con actividad catalítica que son adsorbidos en el CA, lo cual resulta en un notable descenso en la velocidad de decoloración, así como el porcentaje de remoción del colorante, haciendo necesaria la búsqueda de otro material de soporte para la inmovilización de MR que tenga menor capacidad adsorbente para evitar la adsorción de productos autocatalíticos. Además, se requieren futuros experimentos para identificar y aislar el PB de interés que posee esa capacidad autocatalítica, ya que los PB también podrían ser usados como MR durante la biotransformación reductiva de colorantes azo.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
2. IMPACTO DE EFLUENTES TEXTILES COLOREADOS Y SU CONTRIBUCIÓN A LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA.....	11
2.1 COLORANTES AZO.....	12
2.2 TECNOLOGÍAS PARA EL TRATAMIENTO DE EFLUENTES TEXTILES.....	12
2.2.1 Tratamientos fisicoquímicos.....	13
2.2.2 Tratamientos biológicos.....	13
2.2.3 Digestión anaerobia.....	19
2.2.4 Aceptor de electrones alternativo.....	21
2.2.5 Aplicación de mediadores redox (MR).....	22
2.2.6 Inmovilización de mediadores redox.....	23
2.2.7 Microorganismos reductores de humus (MRH).....	25
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVOS	34
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	34
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	35
6.1 REACTIVOS E INÓCULO.....	35
6.2 MEDIO DE CULTIVO.....	35
6.3 INMOVILIZACIÓN DE AQDS Y DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSFERENCIA DE ELECTRONES	35
6.3.1 Isotermas de adsorción de AQDS en CA.....	35
6.3.2 Inmovilización de AQDS en CA.....	36
6.3.3 Capacidad de transferencia de electrones (CTE) del CA y CA-AQDS.....	37
6.4 BIOTRANSFORMACIÓN DE COLORANTES EN PRESENCIA DE MR_{inm}	37
6.4.1 Isotermas de adsorción de colorantes en CA.....	37
6.4.2 Biotransformación de rojo congo y azul directo 71 en presencia de MR_{inm}	38
6.5 ENRIQUECIMIENTO DE MICROORGANISMOS REDUCTORES DE HUMUS.....	39
6.5.1 Cinética de biotransformación de RC con lodo enriquecido.....	39
6.5.2 Actividad de reducción de quinonas.....	40
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
7.1 INMOVILIZACIÓN DE AQDS Y CTE.....	42

7.1.1 Isotermas de adsorción de AQDS en CA.....	42
7.1.2 Inmovilización de AQDS en CA.....	42
7.1.3 Capacidad de transferencia de electrones (CTE) del CA y CA-AQDS.....	44
7.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE COLORANTES EN PRESENCIA DE MR _{INM}	44
7.2.1 Isotermas de adsorción de colorantes en CA.....	44
7.2.2 Cinéticas de biotransformación RC en presencia de CA-AQDS.....	46
7.2.3 Cinéticas de biotransformación AD71 en presencia de CA-AQDS.....	47
7.3 ENRIQUECIMIENTO DE MICROORGANISMOS REDUCTORES DEL HUMUS.....	49
7.3.1 Reducción de quinonas y remoción de DQO.....	49
7.3.2 Cinética de biotransformación de RC con lodo enriquecido.....	51
7.3.3 Actividad de reducción de quinonas.....	54
8. CONCLUSIONES.....	56
9. BIBLIOGRAFÍA.....	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplo de colorantes mono-, di- y tri-azo.	12
Figura 2. Mecanismo propuesto para la degradación aerobia de colorantes azo. 15	
Figura 3. Mecanismo propuesto para la decoloración anaerobia de colorantes azo	16
Figura 4. Mecanismo propuesto para la reducción de colorantes azo por <i>S. oneidensis</i>	18
Figura 5. Digestión de materia compleja en ambientes metanogénicos.....	21
Figura 6. Mecanismo propuesto para la reducción anaerobia de un colorante azo acoplado a la oxidación de acetato	26
Figura 7. Isoterma de adsorción de AQDS en CA.....	42
Figura 8. Pruebas de desorción del AQDS en CA.	43
Figura 9. Isoterma de adsorción de RC en CA.....	45
Figura 10. Isoterma de adsorción de AD71 en CA.	46
Figura 11. Cinética de biotransformación de RC en presencia de CA-AQDS....	47
Figura 12. Cinética de biotransformación de AD71 en presencia de CA-AQDS.	49
Figura 13. Desempeño de los rectores en cuanto a la remoción de DQO durante el enriquecimiento.....	50
Figura 14. Desempeño del reactor con biomasa enriquecida en cuanto a la formación de AH ₂ QDS durante la etapa del enriquecimiento.	51
Figura 15. Cinéticas de biotransformación de RC en presencia de MR _{sol}	53

Figura 16. Cinética de reducción de quinonas con biomasas enriquecida y control.....	55
Figura 17. Adsorción de PB del AD71 en CA.....	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Diversidad filogenética de microorganismos reductores de humus reportados en la literatura.	27
Tabla 2. Capacidad de transferencia de electrones de CA y CA-AQDS.....	44
Tabla 3. Tasas y porcentajes de decoloración de RC usando ambas biomasas con y sin MR.....	54
Tabla 4. Sitios ácidos y básicos por gramo de CA.	70

1. INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la sobrepoblación y la creciente demanda de productos provocan un notable aumento de la actividad industrial, lo cual a su vez genera una gran cantidad de residuos de diferente índole. En el caso de las industrias textiles, se liberan efluentes contaminados con colorantes del tipo azo, que sino no son tratados de manera adecuada contribuyen a la contaminación de cuerpos de agua, afectando especies acuáticas y poniendo en riesgo la salud humana. Hasta hoy, se han desarrollado múltiples metodologías para el tratamiento de estos efluentes coloreados; sin embargo, la digestión anaerobia ha resultado una excelente alternativa para el tratamiento de estos contaminantes desde el punto de vista sustentable y amigable con el medio ambiente. Otro punto a favor de esta tecnología es que sus eficiencias de remoción pueden verse mejoradas mediante la adición de mediadores redox (MR), como la anthraquinona-2,6-disulfonato (AQDS), que actúan como catalizadores durante la decoloración de los efluentes. Además, la inmovilización del MR disminuye la necesidad de su adición constante durante el tratamiento, lo que convierte a la digestión anaerobia en una tecnología mucho más económica y promisoría para el tratamiento de efluentes textiles. El proceso microbiológico de la decoloración reductiva se da gracias a la actividad microbiana de una amplia variedad de microorganismos, sin embargo, la efectividad del tratamiento depende de la supervivencia y de los microorganismos seleccionados para llevar a cabo el proceso, y una estrategia para combatir esta limitante es mediante el establecimiento de microorganismos reductores de humus (MRH), los cuales ya se encuentran presentes en los consorcios anaerobios en cantidades bajas, y al estimular su establecimiento selectivo dentro del consorcio se verá incrementada la tasa de decoloración, ya que éstos son capaces de usar el AQDS como catalizador durante la decoloración reductiva de los colorantes azo.

2. IMPACTO DE EFLUENTES TEXTILES COLOREADOS Y SU CONTRIBUCIÓN A LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA

En los últimos años la industria textil ha crecido económicamente a nivel nacional e internacional, alcanzando una gran producción. Como consecuencia de esta actividad se generan grandes volúmenes de aguas residuales, que principalmente provienen de la etapa de teñido (O'Neill *et al.*, 1999; Kumar *et al.*, 2008). Además, entre el 10-15% de los colorantes utilizados en esta etapa se pierden en el efluente, debido a que el porcentaje de fijación en las telas es limitado, dependiendo del colorante (O'Neill *et al.*, 1999). Por lo general, los efluentes de este tipo de industrias contienen también una gran cantidad de compuestos orgánicos como surfactantes, suavizantes y fijadores; que junto con los colorantes contribuyen a la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y causan una considerable coloración del efluente (Banat *et al.*, 1996).

La presencia de cantidades muy pequeñas de colorantes en el agua es claramente visible y, por esta razón, el color es el primer contaminante reconocido en las aguas residuales y tiene que ser removido antes de ser descargando en los cuerpos de agua (Banat *et al.*, 1996). Los colorantes afectan no sólo el aspecto estético, sino que también limitan el paso de luz en el agua, comprometiendo los procesos fotosintéticos, hecho que reduce la cantidad de oxígeno disuelto y conduce a la mortalidad de especies acuáticas (Weisburger, 2002). Además, los colorantes textiles representan una amenaza para la salud humana, ya que algunos de sus productos son cancerígenos o mutagénicos (Kalyuzhnyi y Sklyar, 2000). Los colorantes tienen una gran variedad de estructuras: ácida, reactiva, básica, basados en antraquinona, dispersa, azo y diazo. Estos compuestos tienen en común su habilidad para absorber luz en la región visible; sin embargo, los colorantes tipo azo son de difícil tratamiento debido a su estructura recalcitrante, pero el campo de la biorremediación resulta atractivo para el tratamiento de este tipo de contaminantes (Banat *et al.*, 1996).

2.1 Colorantes azo

Los colorantes tipo azo se caracterizan por la presencia de uno o más enlaces -N=N- (mono-, di- y triazo) y representan aproximadamente el 70% de los colorantes utilizados por la industria textil (Hunger *et al.*, 2004). Estos colorantes comúnmente tienen una tasa baja de remoción (Banat *et al.*, 1996), debido a su origen sintético y a su compleja estructura aromática (Figura 1), ya que se sintetizan para resistir la sudoración, jabón, agua, luz o agentes oxidantes (Poots *et al.*, 1976). Esto los hace más estables y menos susceptibles a la biodegradación (Fewson, 1988; Seshadri *et al.*, 1994). Por este motivo, su remoción en efluentes textiles es más importante que la remoción de sustancias orgánicas solubles biodegradables que usualmente contribuyen en la mayor fracción de DQO.

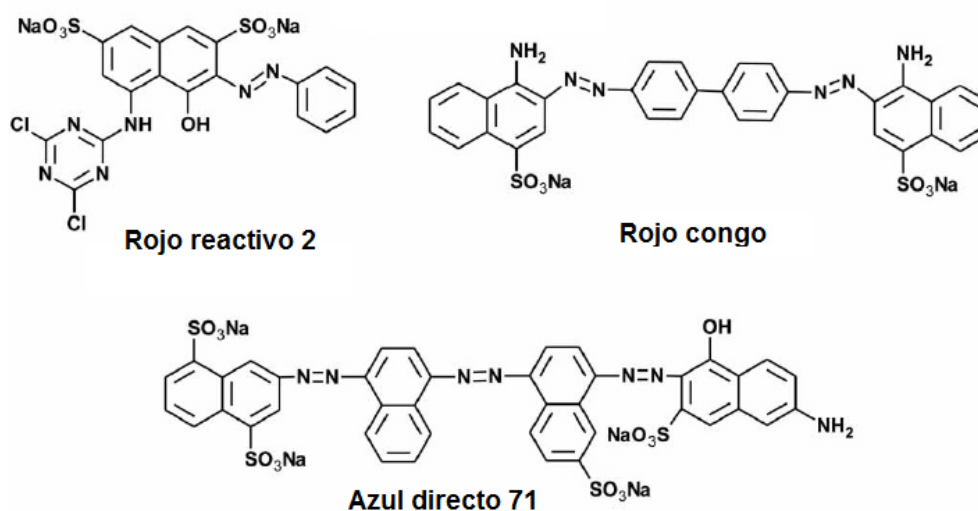


Figura 1. Ejemplo de colorantes mono-, di- y triazo (Alvarez *et al.*, 2015).

2.2 Tecnologías para el tratamiento de efluentes textiles

En los últimos años el tratamiento de efluentes textiles ha adquirido gran importancia ya que muchas plantas textiles están en localizadas dentro de las ciudades o en zonas rurales cercanas a ríos o lagos. Debido a esta problemática, industrias e investigadores, se han visto obligados a desarrollar

nuevos tratamientos o tecnologías innovadoras dirigidas especialmente para la decoloración de efluentes textiles (Banat *et al.*, 1996).

2.2.1 Tratamientos fisicoquímicos

Los sistemas de tratamiento municipal convencionales, principalmente dependen del uso de procesos fisicoquímicos y, ocasionalmente, en conjunto con un tratamiento biológico (Banat *et al.*, 1996). Existen numerosos procesos fisicoquímicos como floculación, electroflotación, filtración por membrana, coagulación, oxidación y reducción electroquímica, intercambio iónico, irradiación, ozonación y adsorción, que pueden ser utilizados para tratar efluentes que contienen colorantes (Banat *et al.*, 1996). Algunas de estas técnicas han demostrado ser efectivas, aunque presentan ciertas inconveniencias. Entre las desventajas se pueden mencionar la producción excesiva de lodos, con sus problemas de disposición; altos costos de operación, falta de efectividad en la reducción del color, (particularmente los colorantes azo sulfonados), sensibilidad a condiciones variables del influente (Banat *et al.*, 1996; Robinson y McMullan *et al.*, 2001) y el uso excesivo de químicos, lo cual provocaría una contaminación secundaria.

2.2.2 Tratamientos biológicos

Por otro lado, el tratamiento de los efluentes textiles puede ser posible por procesos biológicos, incluso sin la adición de otra fuente de carbono o reactivos muy costosos, como es el caso de los efluentes municipales (Banat *et al.*, 1996), que contienen una gran cantidad de materia orgánica que puede ser usada como sustrato para los microorganismos encargados de la biodegradación.

2.2.2.1 Tratamientos aerobios

Hasta ahora se han reportado una gran cantidad de bacterias capaces de llevar a cabo la decoloración de los efluentes. En los años 1970, se inició el aislamiento de cultivos de bacterias capaces de degradar los colorantes azo, encontrándose cepas de *Bacillus subtilis* (Horitsu *et al.*, 1977), *Aeromonas hydrophila* (Idaka y Ogawa, 1978) y *Bacillus cereus* (Wuhrmann *et al.*, 1980).

No obstante, el aislamiento de tales microorganismos demostró ser una tarea difícil y el mecanismo de decoloración era desconocido. Para los años 1980 ya se buscaba la capacidad de degradar colorantes en otros tipos de microorganismos, por ejemplo, los hongos de la podredumbre blanca *Phanaerochaete chrysosporium* (Eaton *et al.*, 1980) y *Tinctoporia sp.* (Fukuzuni, 1980), que resultaron buenos candidatos para la degradación de un amplio rango de compuestos xenobióticos recalcitrantes incluyendo colorantes azo y con dichos estudios se consiguió establecer un mecanismo de degradación. Sin embargo, bajo condiciones aerobias la remoción de color resultó lenta (Haug *et al.*, 1991), ya que se realiza de manera secuencial y en varios pasos (Figura 2) mediante la acción de varias enzimas como lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y/o lacasa (Michel *et al.*, 1991).

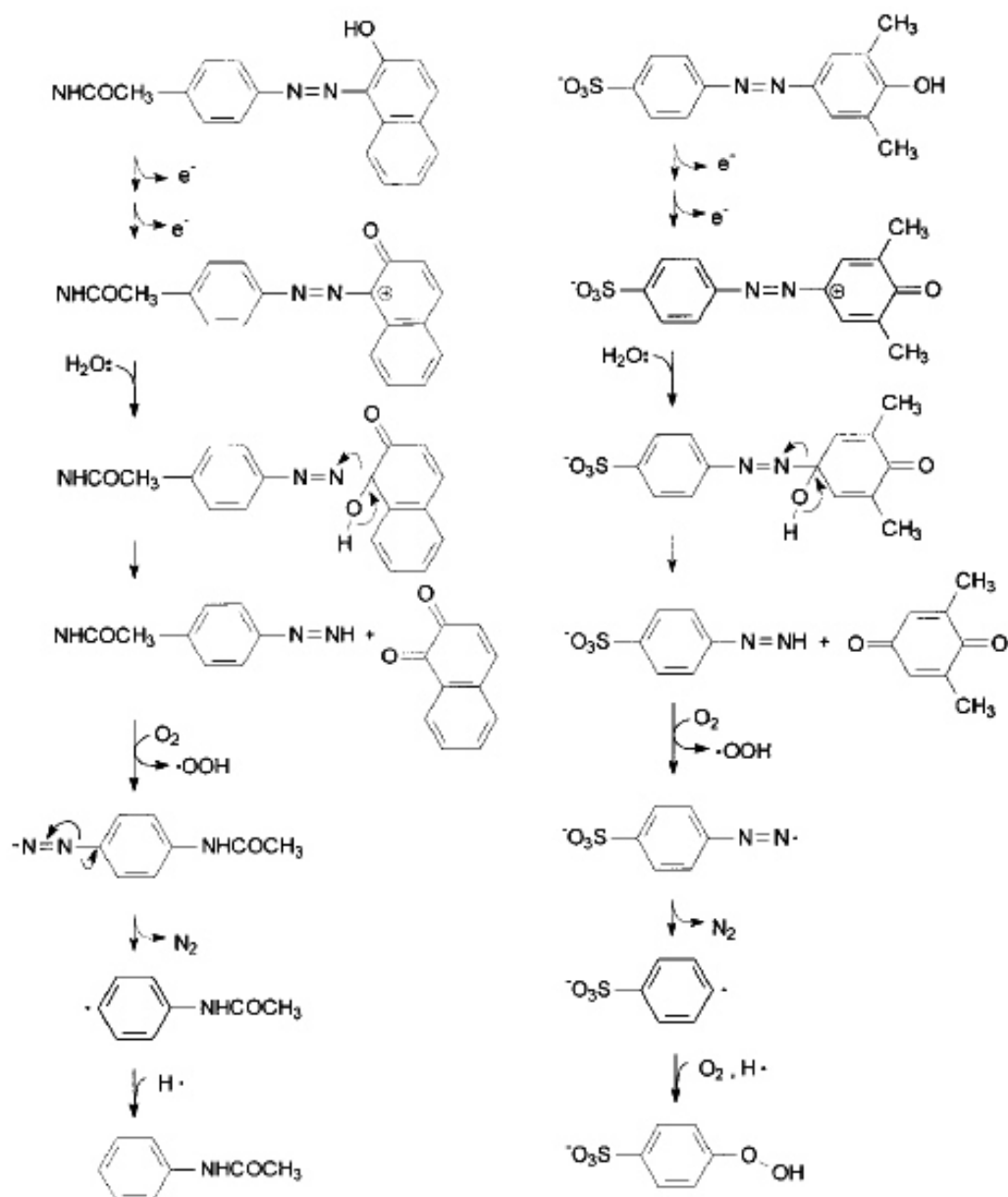


Figura 2. Mecanismo propuesto para la degradación aerobia de colorantes azo (Stolz, 2001).

2.2.2.2 Tratamientos anaerobios

Bajo condiciones anaerobias se ha podido alcanzar buenas eficiencias de decoloración gracias a una enzima azoreductasa (AR) que es responsable del inicio de la degradación del colorante (Stolz, 2001) (Figura 3).

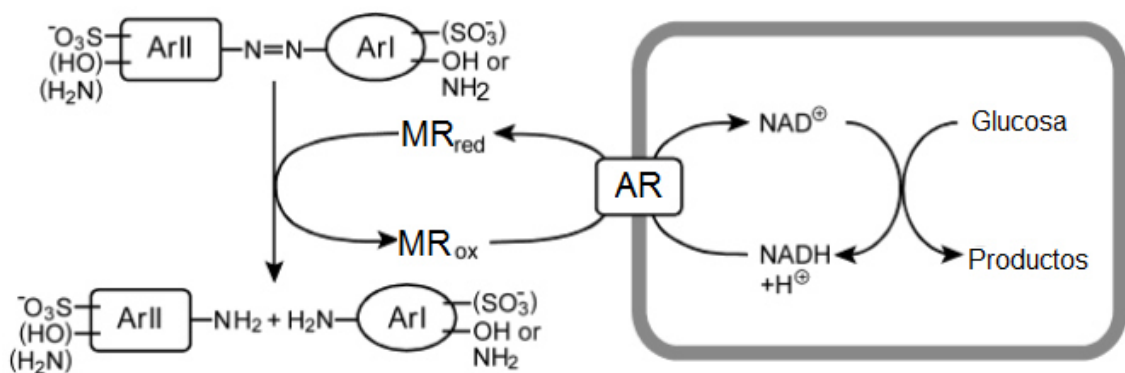


Figura 3. Mecanismo propuesto para la decoloración anaerobia de colorantes azo (Stolz, 2001).

Hong *et al.* (2007) reportaron por primera vez que la reducción anaerobia de un colorante azo (por *Shewanella decolorationis* S12) está ligada a su digestión anaerobia, la transferencia de electrones y la conservación de energía, sugiriendo que la reducción de este tipo de compuestos es una forma de respiración microbiana acoplada a la oxidación de un sustrato orgánico como fumarato, acetato, piruvato o inorgánico como el H_2 . Experimentos de inhibición sobre la respiración demostraron que deshidrogenasas, citocromos y menaquinonas son componentes esenciales para la transferencia de electrones involucrados en la reducción un colorante azo. Además, la energía puede ser conservada al acoplar dicha reducción con un compuesto azo o $Fe(III)$ como único aceptor de electrones en las vesículas membranales de *Shewanella decolorationis* S12. Estos experimentos sentaron algunas bases para elucidar el mecanismo de la reducción anaerobia de colorantes; sin embargo, no fue hasta dos años después cuando se identificaron y comprendieron todos los componentes moleculares involucrados en la decoloración por *Shewanella decolorationis* MR-1 (Brige *et al.*, 2008; Hong y Gu, 2009) demostrando que la decoloración es un proceso reductivo extracelular que requiere de diversos componentes en la ruta de transferencia de electrones, constituida por la membrana citoplasmática, el periplasma y componentes de la membrana externa. En la membrana citoplasmática, una fumarato-deshidrogenasa, una

menaquinona y el citocromo CymA son los componentes cruciales de la ruta de transferencia de electrones, que luego se ramifica a través de una red de citocromos periplásmicos (MtrA y NP) a tres citocromos en la membrana externa (OmcA, OmcB y MtrF). Las proteínas clave en esta ramificación son MtrA en el periplasma y OmcB en la membrana externa.

Cuando se usa el fumarato como donador de electrones, estos son transferidos a una menaquinona (MQ) a través de la fumarato deshidrogenasa (FDH), ubicada en la membrana citoplasmática, de la cual son transferidos al citocromo CymA y posteriormente a los citocromos MtrA y OmcB, que son los componentes clave de la ruta consecutiva al citocromo CymA, ya que al parecer existen rutas alternativas para flujo de electrones hacia los colorantes a través de la red de citocromos C en la membrana externa (Brigé *et al.*, 2008). Debido a su ubicación en la membrana externa, los citocromos OmcA, OmcB y MtrF, pueden actuar como reductor terminal del colorante. El mecanismo propuesto para la reducción de colorantes azo se observa en la Figura 4. Otro aspecto importante a considerar, involucrado en el mecanismo de transferencia de electrones es la formación metabólica de mediadores redox que puedan incrementar la reducción de un colorante de manera no enzimática, ya que muchos microorganismos, entre ellos *Shewanella algae* BrY son capaces de producir un polímero con grupos quinona y propiedades electroquímicas llamada melanina, la cual actúa como mediador redox (MR) en la reducción del colorante (Turik *et al.*, 2002; Brigé *et al.*, 2008).

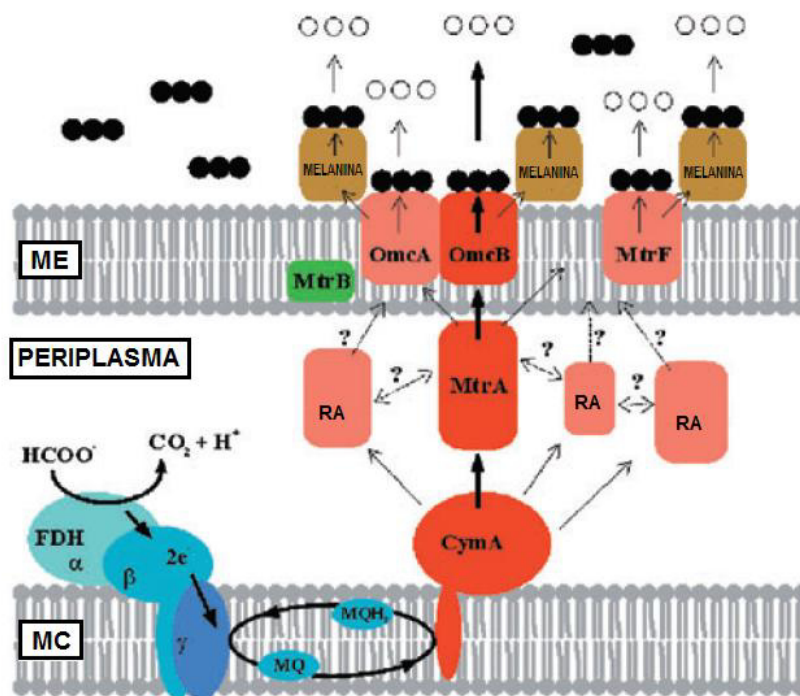


Figura 4. Mecanismo propuesto para la reducción de colorantes azo por *S. oneidensis* (Brigé *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009). Los círculos negros representan el colorante azo. Los círculos blancos representan los productos de la decoloración. (RA) rutas alternativas para flujo de electrones hacia los colorantes a través de la red de citocromos C.

Recientemente se han estudiado y aislado una gran cantidad bacterias reductoras de colorantes azo, incluyendo géneros como *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Hong *et al.*, 2008). Este estudio incrementó significativamente el número de aislados bacterianos capaces de reducir colorantes azo, y demuestra que la ubicuidad de la reducción puede ser resultado de la presencia de diversos microorganismos capaces de reducir dichos compuestos con H_2 , o ácidos grasos de cadena corta como donadores de electrones (Hong *et al.*, 2008). A pesar de que la reducción anaerobia de un colorante azo puede lograrse fácilmente con diferentes microorganismos, hasta el momento no hay reporte de una cepa capaz de decolorar una amplia gama de colorantes. Por ello, el uso de una cepa específica o sus enzimas en la decoloración reductiva no tiene mucho sentido para el tratamiento de efluentes textiles, los cuales están conformados por muchos tipos de colorantes (Laszlo, 2000). Por otro lado, el uso de cultivos mixtos como el lodo granular anaerobio

(compuesto de pellets microbianos estables con alta actividad) es probablemente la alternativa más lógica, ya que representan cajas negras para los procesos de biorremediación (Watanabe y Baker, 2000) considerando la variedad de especies microbianas en el gránulo, y que algunas puedan llevar a cabo la decoloración de manera colectiva, lo que ninguna cepa individual puede lograr independientemente (Knapp y Newby, 1995; Banat *et al.*, 1996; Nigam *et al.*, 1996; Pearce *et al.*, 2003; dos Santos *et al.*, 2007).

2.2.3 Digestión anaerobia

La digestión anaerobia es un importante proceso que ha sido utilizado en el tratamiento de aguas residuales, incluyendo la remoción de colorantes azo (Georgiou y Aivasidis, 2006). Debido a que los colorantes son compuestos electrofílicos, pueden ser usados como aceptores finales de electrones en condiciones anaerobias, conduciendo a la reducción de su grupo cromóforo, y en la mayoría de los casos la pérdida del color. Además, ya ha sido ampliamente documentado que bajo estas condiciones es más eficiente en la degradación de colorantes azo que su contraparte bajo condiciones aerobias (Baêta *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2006; Méndez-Paz *et al.*, 2005). De acuerdo a Gujer y Zehnder (1983) durante el proceso de tratamiento la materia orgánica es hidrolizada primeramente. Enzimas producidas por bacterias fermentativas hidrolizan las moléculas complejas (como proteínas, polisacáridos, ácidos nucleídos y grasas) a sus correspondientes monómeros, que son aminoácidos, azúcares y ácidos grasos de cadena larga. Después, estos monómeros son fermentados a compuestos orgánicos pequeños tales como ácidos grasos de cadena corta, alcoholes y lactato en un paso llamado acidogénesis. Subsecuentemente, estos ácidos pueden ser convertidos en H_2/CO_2 por microorganismos formadores de hidrógeno o en acetato por microorganismos formadores de acetato. El acetato puede también formar parte de la vía H_2/CO_2 en un proceso llamado homoacetogénesis. Por último, el producto final metano/ CO_2 puede ser formado en el proceso de metanogénesis, donde es posible usar directamente sustratos como H_2 , acetato, fumarato y metanol para producir metano. La decoloración reductiva

de los compuestos azo es extremadamente dependiente del tipo del donador de electrones primario. El acetato y otros ácidos grasos volátiles generalmente son pobres donadores de electrones, mientras que la glucosa, etanol, H_2 y formiato son más eficientes donadores de electrones para la reducción de colorantes (Tan *et al.*, 1999; Dos Santos *et al.*, 2003, 2005b; Pearce *et al.*, 2006). La razón por la cual el acetato, metanol y los ácidos grasos volátiles son pobres donadores de electrones para la biotransformación reductiva aún no está clara. Una posible explicación es que los microorganismos metanogénicos acetoclásticos no participan eficientemente en la reducción de colorante, y la principal contribución es atribuida a bacterias fermentativas y metanogénicos hidrogenotróficos. De hecho, se ha propuesto que existe competencia por equivalentes reductores entre los microorganismos reductores de colorantes y otros microorganismos durante todos los pasos de la digestión anaerobia de materia orgánica (Dos Santos *et al.*, 2006b). La conversión de materia orgánica usada tanto para la reducción de colorante o la metanogénesis solo se mantiene si hay un equilibrio entre el grupo de microorganismos sintróficos presentes en el biorreactor (Figura 5). El grado de dependencia entre estos microorganismos varía considerablemente (Schink, 2002), ya que los últimos miembros de la cadena alimentaria son dependientes de los primeros. Esta interdependencia entre microorganismos metanogénicos y acetogénicos, puede ser extremadamente importante para los primeros organismos en la cadena alimenticia mediante la remoción de productos metabólicos (Schink, 1997).

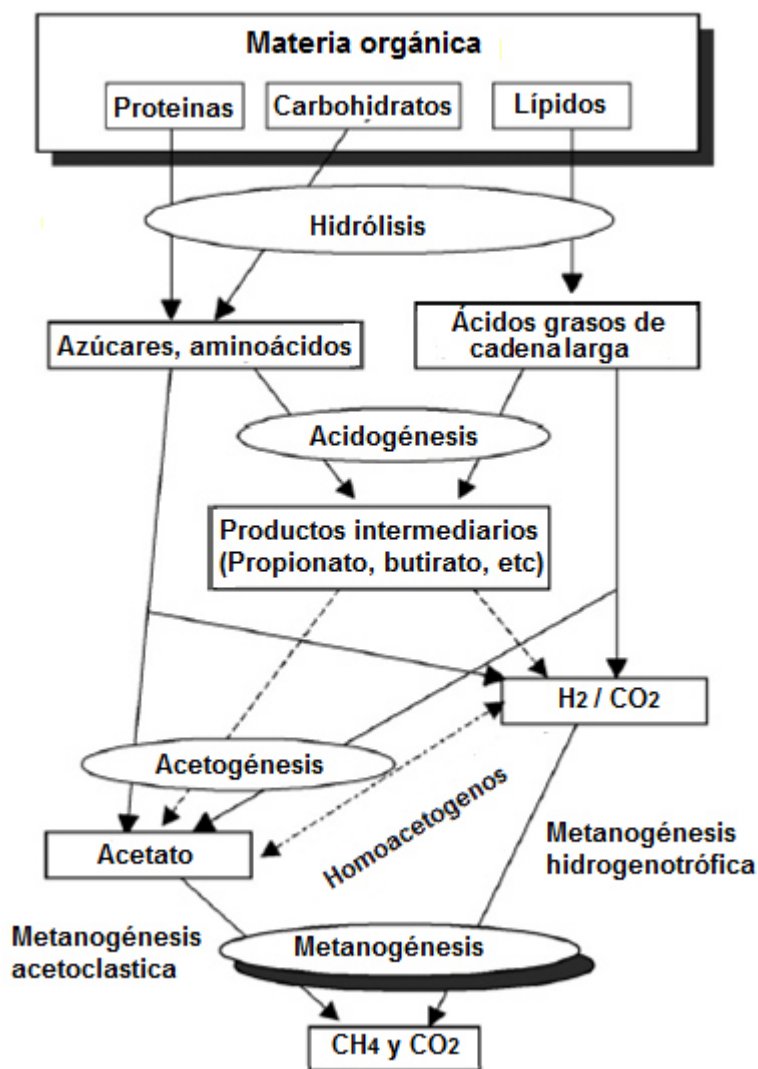


Figura 5. Digestión de materia compleja en ambientes metanogénicos (Gujer y Zehnder, 1983).

Dado las obvias ventajas ofrecidas por la digestión anaerobia, así como su bajo costo de instalación y operación, se ha considerado como una alternativa promisorio para el tratamiento de los efluentes textiles.

2.2.4 Aceptor de electrones alternativo

La reducción de colorantes azo es una reacción de oxidación-reducción en la cual el colorante actúa como un aceptor de electrones. La presencia de un aceptor de electrones alternativo puede competir con el colorante azo por

equivalentes reductores, por ejemplo en presencia de nitrato (Lourenco *et al.*, 2000; Panswad y Luangdilok, 2000) o nitrito (Wuhrmann *et al.*, 1980), ambas iones son constituyentes comunes de los efluentes textiles que al competir por los equivalentes reductores provocan bajos niveles de decoloración. Por otro lado, la presencia de sulfato (también constituyente común de los efluentes textiles) no causa un efecto negativo en la reducción de colorantes (Panswad y Luangdilok, 2000; Albuquerque *et al.*, 2005; Van der Zee *et al.*, 2003). El sulfato puede ser biológicamente reducido a sulfuro, y su presencia puede estimular la decoloración de colorantes azo en lugar de suprimirla competitivamente (Albuquerque *et al.*, 2005). En este mismo estudio se evaluó el efecto del hierro férrico durante la decoloración del colorante mono azo naranja ácido 7 (NA7). Tal como el sulfato, el hierro férrico tiene la ambigua propiedad de ser un aceptor de electrones y un precursor de agente reductor para la reducción de colorantes azo. Esto indica que el rol del hierro ferroso, como donador de electrones para la reducción de colorantes azo es más importante que el rol del hierro trivalente como aceptor de electrones. Este hecho sugiere que la pareja Fe(III)/Fe(II) puede actuar como transporte de electrones para transferir equivalentes reductores a partir de la oxidación biológica de un sustrato primario hacia el colorante azo que sería el aceptor de electrones final. Sin embargo, el efecto del hierro férrico en la decoloración de colorantes azo es muy débil comparado con el efecto de algunos mediadores redox más potentes como el humus o algunas quinonas sintéticas (Albuquerque *et al.*, 2005).

2.2.5 Aplicación de mediadores redox (MR)

La reducción anaerobia de muchos colorantes azo puede ser considerada como un proceso relativamente lento (Nigam *et al.*, 1996; O'Neill *et al.*, 2000; Supaka *et al.*, 2004), esta sería la única desventaja de la decoloración biológica de colorantes azo. Sin embargo, para superar este problema, recientemente se ha incluido el uso de MR durante la reducción y así la eficiencia de remoción del colorante se verá incrementada. El uso de MR resulta en tasas de decoloración mucho más elevadas, ya que estos compuestos mejoran la cinética de degradación de colorantes azo actuando como acarreadores de

electrones y aumentando las velocidades de reacción en uno o varios órdenes de magnitud (Cervantes, 2002; Dos Santos *et al.*, 2005a). Entre algunos de los MR reportados están la riboflavina (Field y Brady, 2003; Dos Santos *et al.*, 2005a), la melanina (Turik *et al.*, 2002; Brigé *et al.*, 2008), y otros compuestos quinona (Cervantes *et al.*, 2001; Rau *et al.*, 2002). Durante los últimos años, se ha acumulado suficiente evidencia de que los compuestos quinona y sustancias húmicas pueden jugar un rol muy importantes como MR en procesos de reducción anaerobia, como la biotransformación de contaminantes polihalogenados, nitroaromaticos y colorantes azo (Field *et al.*, 2000). Entre los compuestos quinona mas aplicados como mediadores catalíticos están la antraquinona-2-sulfonato (AQS), lawsona (LQ) y la antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS) (Semde' *et al.*, 1998; Cervantes *et al.*, 2000; Rau *et al.*, 2002; Field y Brady, 2003; Encinas-Yocupicio *et al.*, 2006; Mezohegyi *et al.*, 2008). Sin embargo, a pesar de que la adición continúa de MR solubles (MR_{sol}) en concentraciones catalíticamente activas, ha demostrado incrementar de manera considerable la eficiencia de reducción de colorantes azo, la dosificación de estos implica gastos recurrentes. Además, la descarga continua del MR, que es biológicamente recalcitrante, el cual se pierde durante el lavado o purgado del reactor resulta en una contaminación secundaria (Jing *et al.*, 2009; Van der Zee *et al.*, 2009; Mezohegyi *et al.*, 2008).

2.2.6 Inmovilización de mediadores redox

Un enfoque para eliminar el requisito de la dosificación continúa de mediadores redox es la creación de un nicho para su inmovilización dentro de los reactores anaerobios. Una de las alternativas disponibles es el uso del carbón activado (CA), ya que se considera un recurso natural de MR, contando con una amplia variedad de grupos funcionales en la superficie, y de los cuales los de mayor importancia son los grupos quinona por ser el principal grupo responsable de la capacidad de transferencia de electrones (CTE) (Field *et al.*, 2000). Van der Zee *et al.* (2003) evaluaron la decoloración del colorante azo Rojo Reactivo 2 (RR2) en un reactor anaerobio de flujo ascendente (UASB) al cual se agregó CA como MR, alcanzándose una alta capacidad de decoloración mayor al 90%,

comparado con el 40% obtenido en el reactor control que no contenía CA. En un estudio más reciente (Mezohegyi *et al.*, 2007) se investigó la reducción anaerobia del colorante azo naranja ácido 7 (NA7) en un reactor de flujo ascendente con lecho empacado, al cual se incorporó CA biológicamente modificado. En este estudio se logró una alta eficiencia de decoloración en muy corto tiempo, alcanzando el 99% de decoloración en tan solo 2 minutos. Sin embargo, a pesar de que se ha evidenciado que la capacidad del CA para transferir electrones es la causa principal del incremento en la decoloración, existe una limitante, ya que los efectos catalíticos del CA pueden irse perdiendo gradualmente durante los continuos lavados del reactor (Van der Zee *et al.*, 2009). Otra alternativa para el uso de mediadores redox inmovilizados (MR_{inm}) que se ha estudiado en los últimos años es la inserción de MR quinona en diferentes materiales de soporte (Guo *et al.*, 2007). Mediante esta técnica de inmovilización, los mediadores permanecen unidos y conservando su capacidad redox (Van der Zee *et al.*, 2009).

Uno de los MR que está siendo ampliamente utilizado e inmovilizado para usarse como catalizador durante la decoloración reductiva de colorantes azo es AQDS. Cervantes *et al.* (2010) inmovilizaron AQDS en resinas de intercambio aniónico con el objetivo evaluar su efecto catalítico en la reducción anaerobia de colorantes azo, resultando en un notable incremento en la eficiencia de decoloración mayor al 97% con AQDS inmovilizado, comparado con una eficiencia del 27-74% por parte del control en ausencia de AQDS. Sin embargo, la desorción de las quinonas puede ocurrir cuando el catalizador inmovilizado es expuesto a temperaturas mayores a 25°C, o altas concentraciones de aniones como sulfatos y fosfatos, los cuales son constituyentes comunes de los efluentes textiles y podrían competir con las quinonas por los sitios activos de intercambio iónico en la resina. No obstante, se han investigado otros materiales de soporte para la inmovilización de MR, pero la estabilidad de estas inmovilizaciones ha sido muy limitada, conduciendo a la desorción del catalizador durante los procesos de reducción (Guo *et al.*, 2007). Cervantes *et al.* (2011) demostraron por primera vez que el CA tiene una excelente

capacidad de adsorción para el AQDS (1500 mg AQDS/g CA) debido a las interacciones π entre los anillos aromáticos en la superficie carbonácea y los anillos aromáticos del AQDS. Estas interacciones promueven un apilamiento en multicapa, por lo que el CA resulta una buena alternativa para ser usado como soporte. Además, con este tipo de MR_{inm} se alcanzan eficiencias de decoloración de 86.7%, 81.4% y 86.7% para los colorantes azul directo 71 (AD71), anaranjado de metilo (AM) y negro ericromo (NE), respectivamente, mientras que el control sin AQDS, alcanzó eficiencias de 76.5%, 70.1% y 80.3% para los mismos colorantes, respectivamente. Gracias a estos estudios, se ha evidenciado esta estrategia como promisoría en la inmovilización de MR para tecnologías de biorremediación (Guo *et al.*, 2007; Cervantes *et al.*, 2010; Cervantes *et al.*, 2011).

2.2.7 Microorganismos reductores de humus (MRH)

El humus es el compuesto orgánico natural más abundante en la naturaleza; posee un elevado peso molecular, está altamente polimerizado y tiene baja biodegradabilidad. El humus se forma mediante la descomposición de materia orgánica como plantas y animales por acción de los microorganismos en suelos y sedimentos. Al ser sumamente recalcitrante, el humus puede permanecer largos periodos de tiempo en el ambiente, excediendo los 500 años. Sin embargo, el humus juega un papel muy importante en el transporte de los metales y la fertilidad del suelo (Macalady y Walton-Day, 2011). Además, la presencia de grupos funcionales redox en el humus, como los quinona, promueve tres importantes roles que impactan significativamente la capacidad redox, y el destino de una gran variedad de contaminantes, tanto orgánicos, como inorgánicos: 1) como aceptor terminal de electrones durante la respiración microbiana, 2) como MR entre el donador de electrones y los compuestos aceptores, y 3) como donador de electrones para la reducción microbiana de aceptores más oxidados (Figura 6) (Martínez *et al.*, 2013).

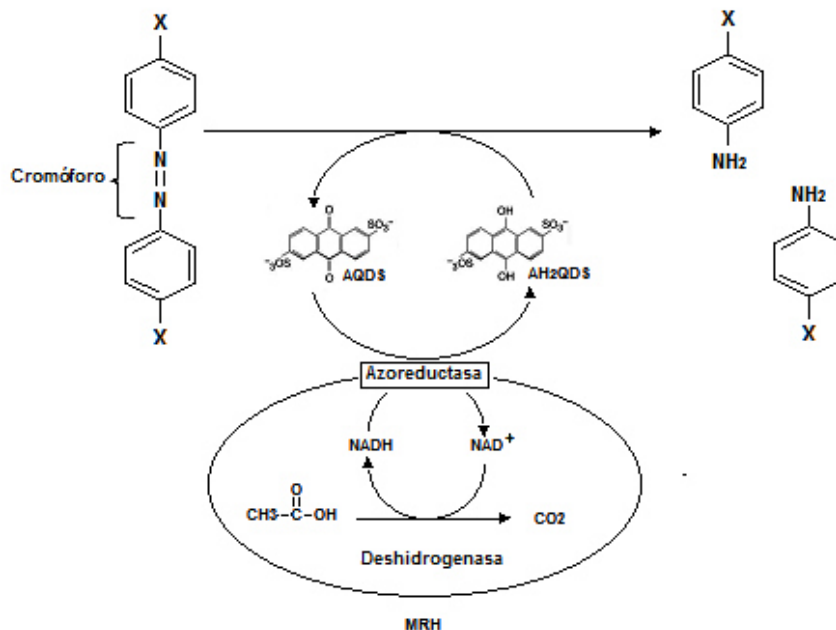


Figura 6. Mecanismo propuesto para la reducción anaerobia de un colorante azo acoplado a la oxidación de acetato (modificado de Pearce *et al.*, 2003).

Lovley *et al.* (1996) fueron los primeros en presentar el concepto de respiración con humus, sustentado por experimentos en los cuales *Geobacter metallireducens* y *Shewanella algae* lograron crecer con humus y/o AQDS como último aceptor de electrones durante la oxidación de una amplia variedad de sustratos orgánicos o H₂. A este tipo de microorganismos se les ha denominado como microorganismos reductores de humus (MRH). Reportes subsecuentes sugieren la ubicuidad de los MRH basado en una amplia diversidad de ambientes, como sedimentos, suelos contaminados y lodos aerobios o anaerobios provenientes de plantas tratadoras de agua, en los cuales se ha observado actividad microbiana para reducir el humus (Coates *et al.*, 1998). Algunos de estos microorganismos incluyen reductores de Fe(III) como *Geobacter spp* (Lovley *et al.*, 1996; Coates *et al.*, 1998a, 2001), reductores de nitrato como *Shewanella putrefaciens*, reductores de sulfuro como *Desulfuromonas spp* (Lovley *et al.*, 1998), bacterias fermentativas como *Propionibacterium freudenreichii* (Ben *et al.*, 1998) y arqueas metanogénicas como *Methanococcus thermolithotrophicus* (Lovley *et al.*, 2000). Además, otros

microorganismos reductores de sulfato como *Desulfovibrio* G11 pueden reducir humus o su análogo AQDS acoplado a la oxidación de hidrógeno. Mientras que la reducción de humus acoplado a la oxidación de acetato está asociada con los microorganismos reductores de Fe(III), incluyendo miembros de la familia *Geobacteraceae* (Lovley *et al.*, 1996; Coates *et al.*, 1998b, 2001). No obstante, los microorganismos reductores de humus pueden competir contra los metanogénicos por varios sustratos orgánicos simples como acetato e hidrógeno lo que podría limitar la decoloración (Cervantes *et al.*, 2000a).

En la actualidad se ha generado información sobre una gran variedad de microorganismos reductores de humus (Martínez *et al.*, 2013) (Tabla 1); sin embargo, aunque ciertas especies microbianas son muy efectivas para remover colorantes azo mediante biotransformación, o biodegradación (Banat *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 1993), la efectividad del tratamiento microbiano también depende de la supervivencia, adaptabilidad y actividad del microorganismo seleccionado (Cripps *et al.*, 1990; Pasti-Grigsby *et al.*, 1992).

Tabla 1. Diversidad filogenética de microorganismos reductores de humus reportados en la literatura.

Filogenia	Cepa	UAE ^a	Crecimiento
Archaea			
<i>Methanococcales</i>	<i>Methanococcus thermolithotrophicus</i>	AQDS	ND
	<i>Methanococcus voltaei</i>	AQDS	-
<i>Methanobacteriales</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	AQDS	ND
	<i>Methanobacterium palustre</i>	AQDS, AH	-
<i>Methanosarcinales</i>	<i>Methanosarcina barkeri</i>	AQDS, AH	-

	<i>Methanolobus vulcani</i>	AQDS	-
	<i>Methanosphaera cuniculi</i>	AQDS, AH	-
<i>Methanomicrobiales</i>	<i>Methanospirillum hungatei</i>	AQDS	-
<i>Methanopyrales</i>	<i>Methanopyrus kandleri</i>	AQDS	ND
<i>Thermoproteales</i>	<i>Pyrobaculum islandicum</i>	AQDS, AH	ND
	<i>Pyrodictium abyssi</i>	AQDS	ND
	<i>Thermococcus celer</i>	AQDS	ND
<i>Thermococcales</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	AQDS	ND
<i>Archaeoglobales</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	AQDS	ND

BACTERIA

Gram Negativas

<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	AQDS	+
	<i>Shewanella alga</i>	AQDS, AH	+
	<i>Shewanella putrefaciens</i>	AQDS	+
	<i>Shewanella saccharophila</i>	AQDS	ND
	<i>Shewanella cinica</i>	AH	ND
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	AQDS	ND
	<i>Geospirillum barnseii</i>	AQDS	ND
	<i>Wolinella succinogenes</i>	AQDS, AH	ND
	<i>Escherichia coli</i> K12	AQS, L	ND
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Sphingomonas xenophaga</i> BN6	AQS	ND
	<i>Paracoccus versutus</i> GW1	AQDS	+
	<i>Azospirillum humicireducens</i>	AQDS	+

<i>β-Proteobacteria</i>	<i>Ralstonia eutropha</i> 335	AQS	ND
	<i>Thauera humireducens</i>	AQDS	+
	<i>Comamonas koreensis strain</i> CY01	AQDS	+
<i>δ-Proteobacteria</i>	<i>Geobacter metallireducens</i>	AQDS, AH	+
	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	AQDS, AH	ND
	<i>Geobacter humireducens</i>	AQDS, AH	ND
	<i>Geobacter</i> JW-3	AQDS, AH	+
	<i>Geobacter</i> TC-4	AQDS, AH	+
	<i>Geobacter grbiciae</i>	AQDS	ND
	<i>Desulfovibrio</i> G11	AQDS	-
	<i>Desulfovibrio idahonensis</i>	AQDS	ND
	<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	DMBQ, NQ	ND
	<i>Desulfuromonas acetexigens</i>	AQDS	ND
	<i>Desulfuromonas</i> SDB-1	AQDS	+
	<i>Desulfuromonas</i> FD-1	AQDS	+
	<i>Desulfobulbus propionicus</i>	AQDS	+
<i>Deinococci</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	AQDS	-
<i>Halanaerobiales</i>	<i>Fuchsiella alkaliacetigena</i>	AQDS	+
<i>Thermotogales</i>	<i>Thermotoga maritima</i>	AQDS	ND
<i>Thermoanaerobacteriales</i>	<i>Calderihabitans maritimus</i>	AQDS	+

Gram positivas

<i>Thermoanaerobacter</i>	<i>Thermoanaerobacter siderophilus</i>	AQDS	+
---------------------------	--	------	---

es

	<i>Carboxydotherrnus pertinax</i>	AQDS	+
	<i>Carboxydotherrnus ferrireducens</i>	AQDS	+
	<i>Carboxydotherrnus siderophilus</i>	AQDS	+
	<i>Carboxydotherrnus hydrogenoformans</i>	AQDS	+
	<i>Thermoterrabacterium ferrireducens</i>	AQDS	+
	<i>Moorella humiferrea</i>	AQDS, AH	+
<i>Bacillales</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	AQS, AQDS, L	ND
	<i>Bacillus pseudofirmus</i> MC02	AQDS, AH	+
	<i>Planococcus</i> sp. MC01	AQDS	ND
	<i>Bacillus thermotolerans</i>	AQDS	+
	<i>Anaerobacillus alkalilacustre</i>	AQDS	+
<i>Actinomycetales</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	AH	-
	<i>Kocuria rosea</i> HN01	AQDS	ND
	<i>Corynebacterium humireducens</i> MFC-5	AH, FA	ND
<i>Lactobacillales</i>	<i>Enterococcus cecorum</i>	AH	-
	<i>Lactococcus lactis</i>	AH, ACNQ	ND
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ACNQ	ND
<i>Clostridiales</i>	<i>Desulfitobacterium hafniense</i> DP7	AQDS	+
	<i>Thermincola ferriacetica</i>	AQDS	+
	<i>Thermincola potens</i>	AQDS	ND
	<i>Desulfitobacterium dehalogenans</i>	AQDS, AH	+

	<i>Desulfitobacterium</i> PCE1	AQDS	+
<i>Campylobacteriales</i>	<i>Sulfurospirillum barnesii</i>	AQDS	+
	<i>Sulfurospirillum deleyianum</i>	AQDS	+
	<i>Sulfurospirillum arsenophilum</i>	AQDS	+

AQDS, antraquinona-2,6-disulfonato; AQS, antraquinona-2-sulfonato; ACNQ, 2-amino-3-carboxy-1,4-naftoquinona; NQ, 1,4-naftoquinona; DMBQ, 2,6-dimethyl-1,4-benzoquinona; L, lawsona (2-hydroxy-1,4-naftoquinona); AH, ácidos húmicos; AF, ácidos fúlvicos; UAE, ultimo aceptor de electrones; ND, no determinado. El signo positivo indica que la reducción microbiana de quinonas o ácidos húmicos estuvo ligada al crecimiento; el símbolo negativo indica que no hubo correlación entre la reducción de quinonas o humus con el crecimiento.

Toda esta diversidad de microorganismos capaces de usar las sustancias húmicas en sus procesos respiratorios, así como la capacidad de dichas sustancias húmicas en ceder electrones para la reducción de contaminantes recalcitrantes, representan un gran potencial biotecnológico. Este potencial, puede ser aprovechado para el mejoramiento en los sistemas de tratamientos de aguas residuales; esto mediante el acoplamiento de las reacciones de oxido-reducción del MR a la reducción de los colorantes azo. Con el desarrollo de estas tecnologías se espera mejorar la eficiencia de biotransformación de colorantes azo. Además, con los MR inmovilizados se tendrá un buen aprovechamiento y reciclado de los MR usados en reactores anaerobios posibilitando su uso a escala real.

3. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento de efluentes textiles en la actualidad se lleva a cabo mediante el uso de consorcios de microorganismos no especializados. El enriquecimiento de microorganismos reductores de humus dentro de un consorcio anaerobio representa una estrategia promisorio para el tratamiento de colorantes azo. Estos microorganismos especializados son capaces de realizar una rápida reducción del colorante azo en presencia de mediadores redox, los cuales catalizan el proceso de decoloración acoplada a los procesos de respiración anaerobia. Por otro lado, la adición recurrente de los mediadores redox durante el proceso anaerobio incrementa en gran medida los costos de operación, por lo que su inmovilización dentro del reactor representa una excelente alternativa para reducir los costos del proceso, además del reciclado de mediadores, ya que éstos pueden usarse durante varios ciclos de tratamiento.

4. HIPÓTESIS

La eficiencia de biotransformación de los colorantes azo por un consorcio anaerobio enriquecido y AQDS inmovilizado es 30% mayor en comparación con un consorcio anaerobio no enriquecido.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la eficiencia de biotransformación de colorantes tipo azo por un consorcio anaerobio enriquecido con microorganismos reductores de humus y AQDS inmovilizada en carbón activado.

5.2 Objetivos específicos

1. Enriquecer selectivamente el consorcio anaerobio mediante la adición constante de AQDS para favorecer el establecimiento de una comunidad microbiana con una mejor capacidad para reducir mediadores redox.
2. Evaluar la actividad reductora del humus y metanogénica del consorcio enriquecido con AQDS y compararla con las obtenidas con el consorcio no enriquecido (original).
3. Modificar el carbón activado mediante la incorporación de AQDS por adsorción asistida con tratamiento térmico y evaluar la desorción de AQDS usando medio basal.
4. Evaluar la capacidad catalítica del carbón activado modificado con AQDS durante la biotransformación de colorantes azo utilizando los consorcios (enriquecido y metanogénico) en reactores en lote.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Reactivos e inóculo

Los compuestos químicos utilizados fueron de grado reactivo. Los compuestos para preparar el medio de cultivo, el AQDS, así como los colorantes azo Azul Directo 71 (AD71) y Rojo Congo (RC), ambos con el 85 % de pureza, fueron adquiridos en *Sigma Aldrich*. Los reactivos utilizados en los ensayos de electroforesis como agarosa y lauril sulfato de sodio (SDS) son de *Sigma Aldrich* y *Bio-Rad*. El carbón activado (CA) usado para la inmovilización del MR es de origen mineral, con un diámetro de 0.5 - 1 mm y proporcionado por CLARIMEX.

6.2 Medio de cultivo

El medio basal usado en el presente estudio se preparó según Álvarez *et al.* (2010), agregando los siguientes componentes (concentración expresada en g/L): NaHCO_3 (3); NH_4Cl (0.3); KH_2PO_4 (0.2); $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.03); CaCl_2 (0.1); y 1 mL/L de solución de elementos traza. La solución de elementos traza fue preparada agregando los siguientes compuestos (concentración expresada en mg/L): $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (2000); H_3BO_3 , (50); ZnCl_2 , (50); $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (38); $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (500); $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, (50); $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (90); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (2000); $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (92); $\text{Na}_2\text{SeO} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, (162); EDTA, (1000); y 1 mL/L de HCl (36%). El pH del medio basal se ajustó a 7 agregando HCl concentrado (36%).

6.3 Inmovilización de AQDS y determinación de la capacidad de transferencia de electrones (CTE)

6.3.1 Isotermas de adsorción de AQDS en CA

Se realizaron pruebas de adsorción para construir las isotermas y para determinar la capacidad de adsorción (Q_e) de AQDS en el CA. Para estas

pruebas de adsorción, se prepararon soluciones de AQDS a concentraciones variables entre 20-200 mg/L, en volúmenes de 30 mL, a las cuales se les agregaron 30 mg de CA. Estos experimentos fueron continuamente agitados a 150 rpm durante 24 h y a una temperatura de 30°C. Se tomaron alícuotas de 3 mL para medir la concentración inicial y final del AQDS mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 325 nm y así determinar la capacidad de adsorción usando la siguiente ecuación.

$$Q_e = V (C_0 - C_{eq}) / m \quad \text{Ecuación 1.}$$

Donde Q_e es la capacidad de adsorción (mg/g); V es el volumen de la solución de AQDS (L); C_0 y C_e son la concentración inicial y en equilibrio de AQDS (mg/L), y m es la masa de CA (g).

6.3.2 Inmovilización de AQDS en CA

Para la inmovilización del MR en el CA se prepararon 1.5 L de una solución de AQDS a una concentración de 1500 mg/L (Cervantes *et al.*, 2011). El pH de la solución de AQDS se ajustó a 4 añadiendo HCl 1 M. Posteriormente, se agregaron 2 g/L de CA previamente tamizado y lavado con un tamaño de partícula de 0.5 – 1 mm. Una vez agregado el CA, se mantuvo a una temperatura de 30°C durante 10 días y con una agitación constante de 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 3 mL al inicio y al final de la agitación para determinar la capacidad de adsorción mediante la ecuación 1. Para favorecer el anclaje covalente de AQDS en el CA (CA-AQDS) y promover una interacción más fuerte, el material CA-AQDS fue separado de la suspensión por filtración y sometido a tratamiento térmico a 100°C por 24 h. Posteriormente, se pusieron en contacto 1.5 L de medio basal y el CA-AQDS con agitación constante (150 rpm) durante 24 h a 30°C. Transcurridas las 24 h del primer lavado, se tomó una alícuota de 3 mL del sobrenadante para determinar la concentración desorbida de AQDS mediante la ecuación 2 y se decantó el medio basal para separar el CA-AQDS. El procedimiento descrito

anteriormente fue realizado seis veces para determinar la desorción del AQDS (Q_d , mg/g) del material modificado.

$$Q_d = [(Q_e)(m) - (C_{eq})(V)]/m$$

Ecuación 2.

6.3.3 Capacidad de transferencia de electrones (CTE) del CA y CA-AQDS

La CTE del CA-AQDS y del CA se determinó microbiológicamente a 30°C y usando 1 g/L de cada material. Las pruebas se realizaron en botellas serológicas con capacidad de 60 mL, a las que se agregaron 0.1 g de SSV/L y 2 g/L de glucosa como donador de electrones. Todas las mediciones de la CTE se llevaron a cabo mediante la técnica de la ferrosina, siguiendo el protocolo descrito por Lovely *et al.* (1996). En este procedimiento se mezcla citrato de Fe(III) con las muestras para obtener una concentración final de 10 mM y se deja reaccionar por 30 min. Después se agregó un volumen igual de HCl 0.5 M. Se tomó una alícuota y fue mezclada con una solución de ferrosina para la determinación espectrofotométrica del Fe(II) a una longitud de onda de 562 nm. La concentración de Fe(II) se usó para calcular la CTE de los materiales. Además, se corrigió la CTE intrínseca del inóculo.

6.4 Biotransformación de colorantes en presencia de mediadores redox inmovilizados (MR_{inm})

6.4.1 Isotermas de adsorción de colorantes en CA

Se llevaron a cabo pruebas de adsorción para construir las isotermas de adsorción y determinar la capacidad de adsorción (Q_e) de los colorantes (rojo congo y azul directo 71) sobre el CA. Para estas pruebas, se prepararon soluciones RC y AD71 (en agua bidestilada) a concentraciones variables entre 20-200 mg/L, en volúmenes de 30 mL, a las cuales se les agregaron 30 mg de CA. Estos experimentos fueron agitados continuamente a 150 rpm durante 24 h y a 30°C. Se tomaron alícuotas de 3 mL al inicio y al final del experimento para medir la concentración de RC y AD71 mediante espectrofotometría a una

longitud de onda de 485 y 579 nm, respectivamente. La capacidad de adsorción de cada colorante se determinó usando la ecuación 1 descrita previamente (sección 6.3.1).

6.4.2 Biotransformación de rojo congo y azul directo 71 en presencia de MR_{inm}

Estas pruebas de biotransformación se realizaron para determinar el efecto catalítico del material sintetizado sobre la decoloración reductiva de los colorantes por un consorcio anaerobio. Las cinéticas de decoloración se realizaron en botellas serológicas con capacidad de 100 mL, a las que se agregaron 29 mL del medio basal, 1 mM de AQDS inmovilizado y 0.1 g SSV/L previamente disgregado en un tamiz malla 40. Una vez inoculadas las botellas, se sellaron con tapones de caucho y anillos de aluminio. Para crear condiciones anaerobias en los cultivos se intercambié la atmósfera de las botellas pasando una mezcla de N_2/CO_2 (80%/20%) durante 5 minutos. Una vez que se alcanzaron condiciones anaerobias, se agregaron 1 g/L de glucosa como sustrato y donador de electrones, y 150 mg/L de los colorantes RC y AD71. La glucosa y los colorantes se agregaron a partir de soluciones stock previamente preparadas. Para los controles se prepararon botellas bajo las mismas condiciones, excepto que el AQDS fue agregado en solución y a concentración de 1 mM. Un segundo control fue incubado en ausencia de mediador redox. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se incubaron a 30°C y 150 rpm. El descenso en la concentración de ambos colorantes durante la incubación fue medido espectrofotométricamente a 485 nm para el RC y a 579 nm para el AD71. Para las lecturas espectrofotométricas se tomaron 100 μ L de muestra y se diluyeron en un buffer de fosfatos, al cual se inyectó una mezcla de N_2/CO_2 (80%/20%) durante 15 minutos para desplazar y sacar el oxígeno disuelto. El factor de dilución utilizado en estas determinaciones fue de 10. Antes de realizar la determinación del colorante RC por espectrofotometría, se oxidaron las muestras con una corriente de aire con la finalidad de eliminar la absorbancia aportada por el AH_2QDS (mediador redox reducido) presente en la solución.

6.5 Enriquecimiento de microorganismos reductores de humus

Se entiende como enriquecimiento a la propagación masiva y selectiva de MRH presentes en el lodo granular anaerobio. El enriquecimiento de los microorganismos se realizó a temperatura ambiente y en una columna de vidrio con capacidad de 730 mL, simulando un reactor UASB. El reactor fue alimentado con medio basal que contenía 1 g/L de DQO (80% acetato y 20% glucosa) y 5 mM de AQDS. El tiempo de residencia hidráulica se mantuvo en 52 horas durante 6 meses. En la época de invierno se construyó una estructura de cartón grueso y aluminio alrededor de los reactores, en la que se acopló un foco de 75 watts con el objetivo de incrementar la temperatura a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante la temporada invernal. Se tomaron muestras del influente y efluente periódicamente con el fin de monitorear el desempeño del reactor en cuanto a la remoción del DQO y la reducción de AQDS. Paralelamente, se operó un reactor control con las mismas características y condiciones, pero el medio basal no contenía AQDS. Se recolectaron muestras del influente y efluente regularmente (0.5 mL) para cuantificar la remoción de DQO. La remoción del DQO se determinó mediante los protocolos establecidos por la Analytical Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. El monitoreo de la reducción de quinonas se llevó a cabo espectrofotométricamente a 450 nm, siguiendo la formación de antrahidroxyquinona-2,6 disulfonato (AH₂QDS), forma reducida de la antraquinona-2,6-disulfonato (AQDS). Para esta determinación se tomaron con regularidad alícuotas de 0.5 mL con una jeringa de 3 mL evitando la exposición al oxígeno y se transfirieron a celdas de espectrofotómetro previamente selladas con parafilm. Las muestras se diluyeron en un buffer de fosfatos, al cual se le pasó una mezcla de N₂/CO₂ (80%/20%) durante 15 minutos para desplazar y sacar el oxígeno disuelto.

6.5.1 Cinética de biotransformación de RC con lodo enriquecido

Estas pruebas se realizaron para evaluar la capacidad de biotransformación de lodo enriquecido durante la decoloración reductiva del colorante RC y en presencia de MR. Las cinéticas de decoloración se realizaron en botellas serológicas con capacidad de 100 mL, a las que se agregaron 29 mL del medio

basal, 1 mM de AQDS inmovilizado o soluble, y 0.1 g SSV/L del lodo enriquecido. Del mismo modo, se realizaron experimentos bajo las mismas condiciones pero con el lodo control (es decir, lodo anaerobio no enriquecido). Una vez inoculadas las botellas, se sellaron con tapones de caucho y anillos de aluminio. Para crear condiciones anaerobias en los cultivos se intercambi6 la atm6sfera de las botellas pasando una mezcla de N₂/CO₂ (80%/20%) durante 5 minutos. Una vez que se alcanzaron condiciones anaerobias, se agregaron 1 g/L de acetato como sustrato y donador de electrones, y 0.5 mL de una soluci6n stock de RC para alcanzar una concentraci6n final de 50 mg/L del colorante RC. El acetato tambi6n se agreg6 a partir de una soluci6n stock previamente preparada. Para los controles se incubaron botellas bajo las mismas condiciones, pero en ausencia de AQDS. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se incubaron a 30°C y 150 rpm. El descenso en la concentraci6n del colorante RC durante la incubaci6n fue medido espectrofotom6tricamente a una longitud de onda de 485 nm. Para las lecturas espectrofotom6tricas se tomaron 100 µL de muestra y se diluyeron en un buffer de fosfatos, al cual se le pas6 una mezcla de N₂/CO₂ (80%/20%) durante 15 minutos para desplazar y sacar el ox6geno disuelto. El factor de diluci6n utilizado en estas determinaciones fue de 10. Antes de realizar la lectura al espectrofot6metro, se oxidaron las muestras con una corriente de aire para eliminar la absorbancia aportada por el AH₂QDS presente en la soluci6n.

6.5.2 Actividad de reducci6n de quinonas

La actividad de reducci6n de quinonas se realiz6 en botellas serol6gicas con capacidad de 100 mL, a las que se agregaron 30 mL del medio basal con AQDS soluble a una concentraci6n de 10 mM y 0.1 g SSV/L de biomasa enriquecida. Adicionalmente se realizaron experimentos bajo las mismas condiciones pero con la biomasa control (no enriquecida). Una vez inoculadas las botellas, se sellaron con tapones de caucho y anillos de aluminio. Para crear condiciones anaerobias en los cultivos se intercambi6 la atm6sfera de las botellas pasando una mezcla de N₂/CO₂ (80%/20%) durante 5 minutos. Una vez que se alcanzaron condiciones anaerobias, se agregaron 2 g/L de acetato

como sustrato y donador de electrones. El acetato se agregó a partir de una solución stock previamente preparada. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se incubaron a 30°C y 150 rpm. Para la determinación de la actividad reductora, se tomaron pequeñas alícuotas a determinado periodos y se evaluó la formación de AH₂QDS a 450 nm. Las muestras se colocaron en celdas de espectrofotómetro previamente selladas con parafilm para evitar al máximo la exposición al oxígeno. Para las lecturas espectrofotométricas se diluyeron las muestras en un buffer de fosfatos, al cual se le paso una mezcla de N₂/CO₂ (80%/20%) durante 15 minutos para desplazar y sacar el oxígeno disuelto. El factor de dilución utilizado en estas determinaciones fue de 10.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Inmovilización de AQDS en carbón activado y capacidad de transferencia de electrones

7.1.1 Isotermas de adsorción de AQDS en CA

La Figura 7 muestra la isoterma de adsorción de AQDS en CA y se observa una capacidad de adsorción de de 71 mg de AQDS/g de CA cuando la concentración en el equilibrio fue 450 mg/L. Estos resultados de las pruebas de adsorción del AQDS en CA se ajustaron adecuadamente con el modelo de Freundlich, el cual sugiere que la adsorción ocurre en multicapas, indicando un mecanismo de adsorción por enlaces π - π gracias a la estructura aromática del AQDS y de los grupos aromáticos en la superficie del CA (Moreno-Castilla, 2004).

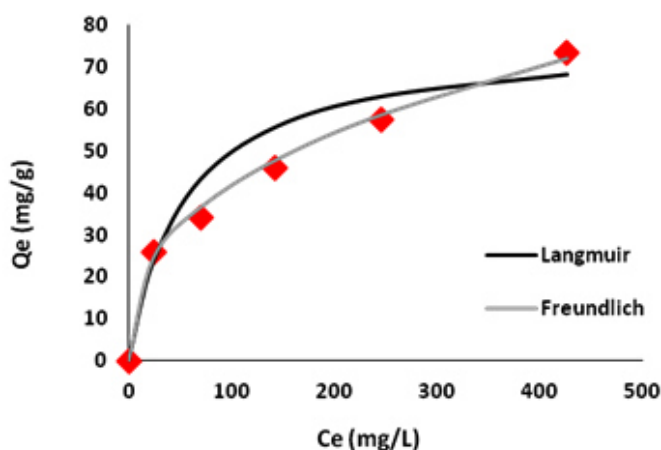


Figura 7. Isotherma de adsorción de AQDS en CA.

7.1.2 Inmovilización de AQDS en CA

El mecanismo de anclaje del AQDS en el CA aún no está definido claramente, pero se sugieren interacciones electrostáticas entre los grupos sulfonato (negativos) con los grupos con carga positiva en la superficie del CA, adsorción multicapa en grupos aromáticos del adsorbato y adsorbente indicando que el mecanismo de adsorción puede ser por apilamiento o enlaces π - π (Moreno-

Castilla, 2004), ya que las moléculas aromáticas son absorbidas en una posición plana en la superficie del CA, y en esta situación la fuerza que impulsa la adsorción se debe a las interacciones π - π entre el anillo aromático del AQDS y la estructura aromática de la superficie del CA. La capacidad de adsorción después de la inmovilización alcanzó valores de 0.276 mmol de AQDS/g de CA; sin embargo, para verificar la fuerza de la inmovilización, se realizaron 6 lavados del CA-AQDS con medio basal. El AQDS mostró una desorción acumulada de 17.76% (Figura 8) demostrando que hay interacciones π - π pero una buena estabilidad de la inmovilización posiblemente atribuida al tratamiento térmico que permite la formación de enlaces covalentes entre el carbón y la AQDS previamente adsorbida.

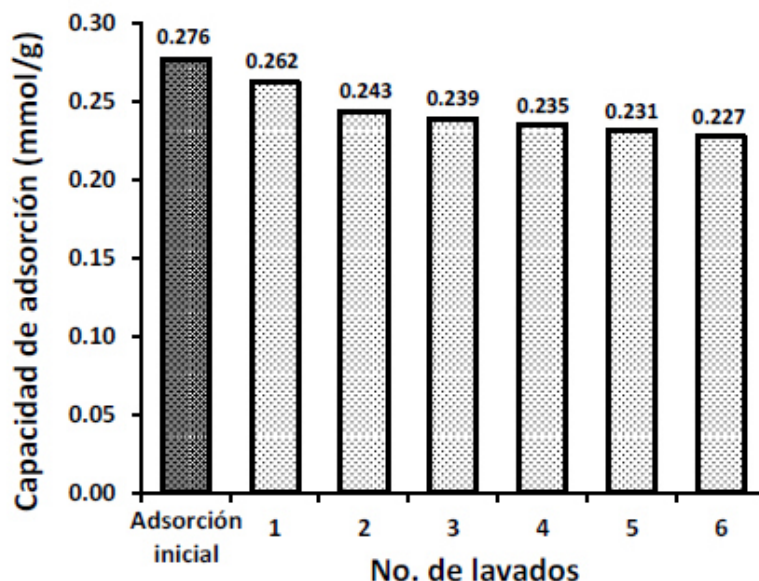


Figura 8. Pruebas de desorción del AQDS en CA.

Los grupos oxigenados de la superficie ácida, localizados en el borde del plano basal en la superficie carbonácea, remueven electrones del sistema electrónico π , creando agujeros positivos en los canales formados por uniones π en la superficie de grafito. De esta manera se da el complejo mecanismo donador-aceptor, entre los grupos carbonilo o hidroxilo del CA y el anillo aromático del grupo quinona en el AQDS (Matson *et al.*, 1969). Sin embargo, la fuerte

interacción solo se mantendrá hasta que la actividad redox de los grupos carbonilo decaiga, por lo que su aplicación aún se ve limitada.

7.1.3 Capacidad de transferencia de electrones (CTE) del CA y CA-AQDS

El CA mostró tener su propia CTE, esto se atribuye a que la superficie carbonacea contiene grupos quinona que podrían estar interactuando en el proceso redox (Baeta *et al.*, 2013). No obstante, la inmovilización del MR en el CA mostró una mejora en la CTE del material (Tabla 2) obteniéndose valores de 0.408 y 0.199 meq/g para el CA-AQDS y CA, respectivamente, lo cual representa un incremento de 2.05 veces. Estos resultados coinciden con los reportados por Ríos del Toro *et al.* (2013), donde se evaluó la decoloración de rojo de metilo con fibras de CA, y tras una modificación del material carbonáceo con ácido nítrico, se incrementó 1.52 veces su CTE. Este incremento se atribuye a la adición de grupos quinona a la superficie carbonácea y, por lo tanto, la inmovilización del AQDS en el CA representa una útil alternativa MR en fase sólida, principalmente gracias a su estructura con grupos quinona, que al incrementar su densidad en la superficie del carbón, aumentará la capacidad de transferencia de electrones.

Tabla 2. Capacidad de Transferencia de Electrones (CTE) de CA y CA-AQDS.

Tipo de CA	CTE (meq/g CA)
CA-AQDS	0.408
CA	0.199

7.2 BIOTRANSFORMACIÓN DE COLORANTES EN PRESENCIA DE MR_{inm}

7.2.1 Isotermas de adsorción de colorantes en CA

Gracias a la cantidad de grupos ácidos en la superficie del CA (Tabla 4, en anexos), así como la naturaleza ácida de los colorantes RC y AD71, se

esperaba una nula adsorción de los colorantes en el CA. Sin embargo, en caso del RC, a pesar de la hipotéticas fuerzas repulsivas entre su estructura ácida y los grupos ácidos del CA se observó una capacidad máxima de adsorción de 0.01 mmol/g (Figura 9). Esto puede atribuirse a que la linealidad y tamaño de la molécula permiten el paso por zonas de baja repulsión y acceder a la estructura porosa del CA. Por el contrario, el AD71 posee una estructura molecular de gran tamaño y con varios grupos sulfonato, características que podrían ser causantes de su nula adsorción en el CA (0.0 mmol/g) (Figura 10). A pesar de que el RC mostró una pequeña adsorción en el CA, la contribución por adsorción en la decoloración durante la biotransformación será insignificante.

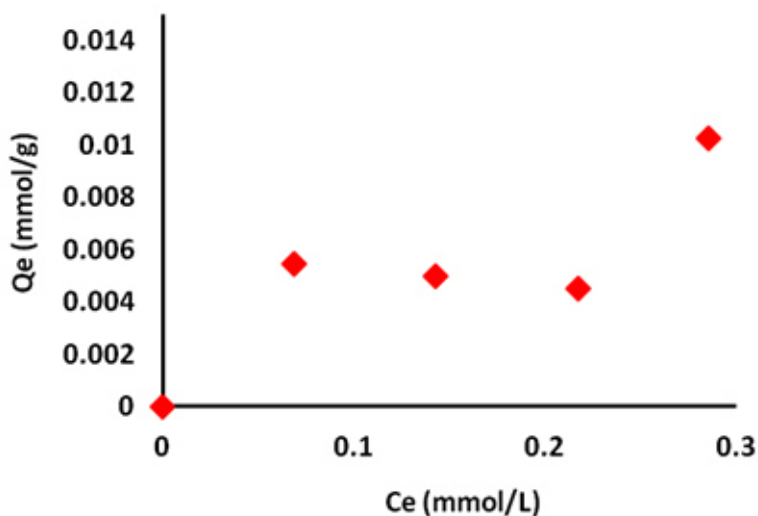


Figura 9. Isterma de adsorción de RC en CA..

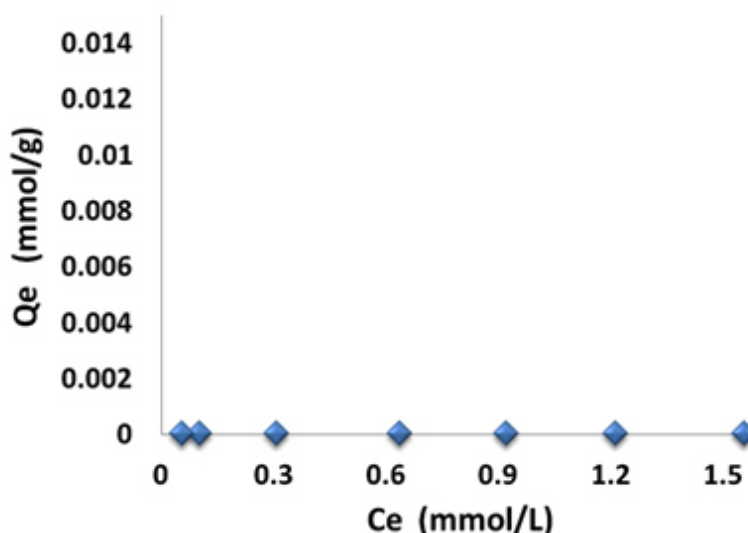


Figura 10. Isotherma de adsorción de AD71 en CA.

7.2.2 Cinéticas de biotransformación de RC en presencia de CA-AQDS

Las cinéticas de reducción anaerobia del colorante RC mostraron una clara diferencia entre los cultivos con MR_{inm} y el control en ausencia de MR. Las pruebas cinéticas con MR_{sol} alcanzaron el mayor porcentaje de decoloración (80.9%) a las 8 h, seguido por el tratamiento con MR_{inm} (45.4% de decoloración). Los controles sin MR, estéril con MR y endógeno, mostraron porcentajes de decoloración muy bajos, con valores de 7%, 1.83% y 1.85%, respectivamente (Figura 11). En cuanto a las tasas de decoloración, se obtuvieron valores de 0.1275, 0.0609 y 0.0165 h^{-1} para los tratamientos con MR_{sol} , MR_{inm} y sin MR, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los experimentos en lote realizados por Costa *et al.* (2010), quienes evaluaron el efecto catalítico de AQDS (50 mM) durante la decoloración reductiva del colorante rojo reactivo 2 (0.3 mM). En el estudio se demostró que la adición de un MR incrementa la velocidad de decoloración cuando se usa acetato como donador de electrones, alcanzado una velocidad de 0.70 h^{-1} y un 88.6% de decoloración en presencia de AQDS, comparado con una velocidad de 0.31 h^{-1} y 87.6% de decoloración en ausencia del mediador. Sin embargo, el uso de glucosa como sustrato y donador de electrones permitió alcanzar decoloraciones del 97.8% sin AQDS y de 96.3% en presencia de AQDS. No

obstante, si se compara la constante cinética de primer orden, la glucosa resultó mejor donador de electrones durante la decoloración, alcanzando tasas de 2.96 y 1.30 h^{-1} con y sin AQDS, respectivamente.

Los resultados indican que la adición de un MR durante el proceso de decoloración (incluso a bajas concentraciones) aumenta tanto el porcentaje de remoción así como la velocidad de decoloración de este tipo de contaminantes. Sin embargo, se requieren experimentos adicionales para determinar la estabilidad del material sintetizado durante varios ciclos de decoloración.

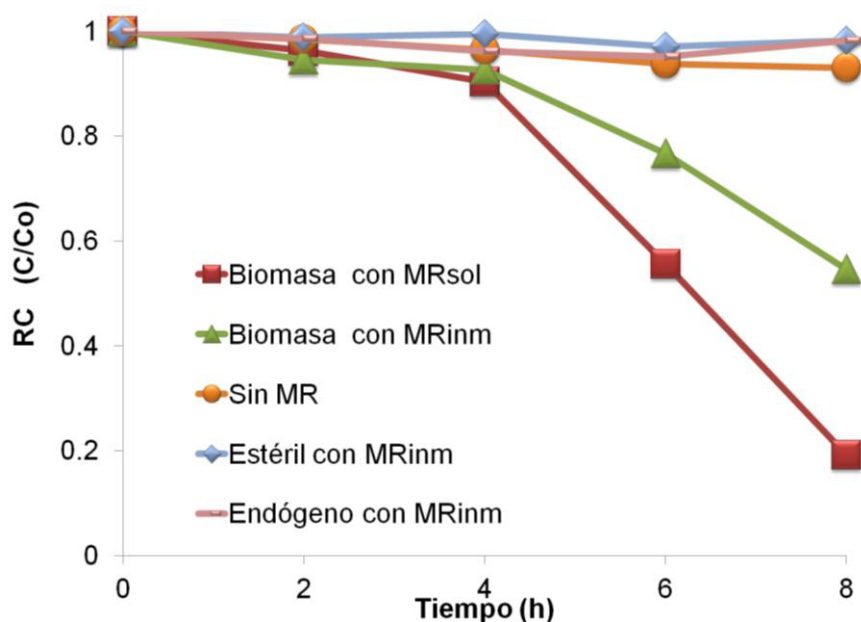


Figura 11. Cinética de biotransformación de RC en presencia de CA-AQDS. Los experimentos se realizaron por triplicado y el porcentaje de error obtenido fue menor que 5% en la mayoría de los casos.

7.2.3 Cinéticas de biotransformación AD71 en presencia de CA-AQDS

Las cinéticas de reducción anaerobia del colorante AD71 se comportaron de una manera distinta en comparación a los experimentos con RC. En la Figura 12a se observa que el experimento de cinética de biotransformación con biomasa y MR_{inm} no tuvo la capacidad de decolorar el AD71 de manera eficiente (solo 11.3%); sin embargo, la prueba con biomasa sin MR se alcanzó

una eficiencia de decoloración de 48.9% después de 9 h. Por otro lado, el tratamiento con MR_{sol} alcanzó el mayor porcentaje de decoloración (69.29 %) tras 9 h de incubación. Los experimentos control (estéril y endógeno, ambos con MR_{inm}) mostraron eficiencias de decoloración muy bajas, con valores de 2.9% y 4.8%, respectivamente.

Las tasas de decoloración observadas fueron de 0.144, 0.0125 y 0.0805 h^{-1} para los tratamientos con MR_{sol} , MR_{inm} y sin MR, respectivamente. Estos resultados indican que la presencia de MR_{inm} (CA-AQDS) afecta la reducción del AD71. Sin embargo, en las incubaciones con MR_{sol} se observa un incremento tanto en la velocidad como en la eficiencia de decoloración, por lo que se descarta la posibilidad de algún efecto tóxico del AQDS sobre el lodo anaerobio. En estudios previos se ha reportado que durante la biotransformación reductiva de algunos colorantes azo se generan aminas aromáticas producto de la ruptura del enlace azo ($-N=N-$), las cuales tienen actividad catalítica durante la decoloración, tal como un MR (Encinas-Yocupicio *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2015). La Figura 12b muestra uno de los productos de biotransformación del AD71, al cual puede atribuirse la capacidad auto-catalítica y que actúa como MR. Ahora bien, los resultados obtenidos en el cultivo con MR_{inm} (CA-ADQS) y lodo anaerobio, en donde hubo una baja eficiencia de decoloración (11.3%), indican que no hay un efecto de auto-catálisis atribuida a la amina que se produce, posiblemente debido a la adsorción de este compuesto sobre el CA-AQDS. Experimentos posteriores confirmaron que los productos de biotransformación del AD71 son fácilmente adsorbidos por el CA desde etapas tempranas de la incubación (Figura 17 mostrada en anexos). La auto-catálisis observada con AD71 impiden evaluar de forma adecuada el efecto de la adición de CA-AQDS y su rol como MR_{inm} en las pruebas de biotransformación, de tal forma que en los experimentos posteriores se decidió utilizar solamente el colorante RC, cuyos productos de biotransformación no tienen un efecto auto-catalítico.

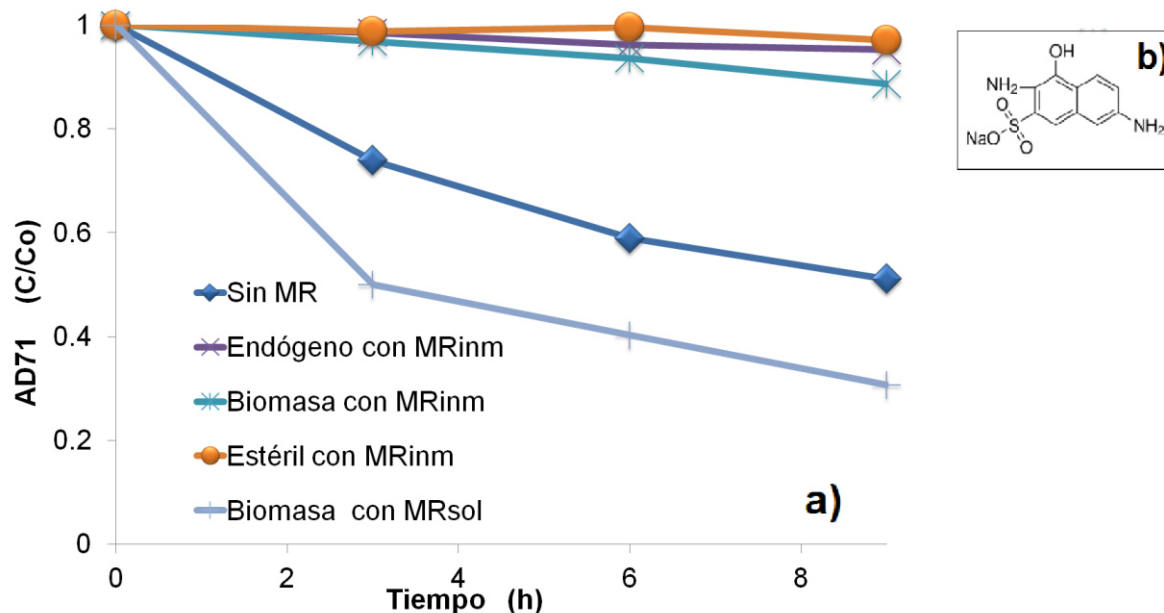


Figura 12. (a). Cinética de biotransformación de AD71 en presencia de CA-AQDS. (b). Amina generada durante la biotransformación del AD71, a la que se atribuye la capacidad (auto)catalítica

7.3 ENRIQUECIMIENTO DE MICROORGANISMOS REDUCTORES DEL HUMUS

7.3.1 Reducción de quinonas y remoción de DQO

La adición continua de AQDS al reactor con lodo anaerobio permitió enriquecer de manera selectiva el consorcio y establecer una comunidad microbiana con una mejor capacidad de utilizar este compuesto como aceptor final de electrones. Después de seis meses de operación, el reactor suplementado con AQDS mostró una mayor eficiencia de eliminación de DQO comparado con el reactor donde no se adicionó AQDS, obteniéndose valores de 98.1% y 91.5%, respectivamente (Figura 13). El incremento en la eficiencia de remoción por la biomasa enriquecida puede atribuirse a la presencia de MRH en óptimas condiciones metabólicas, que gracias a la presencia de AQDS como último aceptor de electrones continuaron reproduciéndose, consumiendo más sustrato y a mayor velocidad que los microorganismos metanogénicos en la biomasa control. Sin embargo, estos resultados difieren con los obtenidos por

Cervantes *et al.* (2013) donde la biomasa enriquecida obtuvo una menor eficiencia de remoción del DQO (71%), comparado con el 92% obtenido por la biomasa control, Esta diferencia podría atribuirse al TRH, el cual pudiera no haber sido suficiente para estimular el adecuado establecimiento de especies reductoras de humus, sin embargo serán necesarios futuros estudios para determinar el TRH óptimo para el establecimiento de estas especies bacterianas. No obstante, los porcentajes de remoción del DQO, resultan suficientes para indicar que las biomásas han sido adaptadas y se encontraban muy activas y listas para ser usadas en los experimentos posteriores. Sin embargo, en la Figura 13 se puede apreciar una caída en la eficiencia de remoción del DQO alrededor del día 75, la cual coincidió con el descenso de la temperatura ambiental durante la época de invierno; no obstante, el desempeño de los reactores se recuperó después de suministrar calor a los reactores mediante una lámpara para mantener la temperatura a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

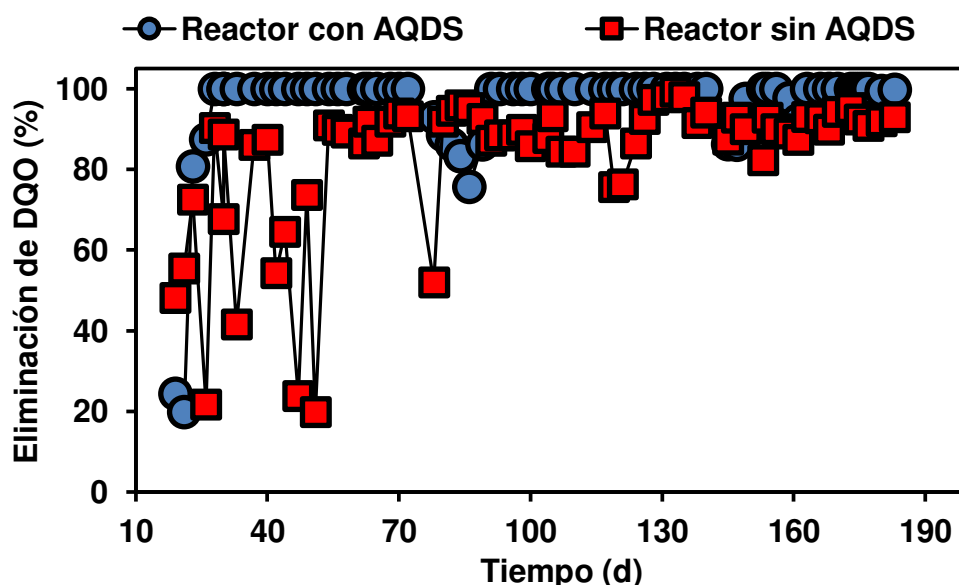


Figura 13. Desempeño de los reactores con respecto a la remoción de DQO durante el enriquecimiento de la biomasa.

Por otro lado, el reactor con AQDS mostró una eficiencia de 84% para la producción AH_2QDS , que es la forma reducida de la AQDS, indicando que la biomasa enriquecida se encuentra activa con especies capaces de usar este

MR durante la digestión anaerobia. El valor de reducción alcanzando durante la etapa final de operación del reactor (día 135-190) fue de 4.2 ± 0.58 mM en el efluente (Figura 14). De la misma manera que el consumo de DQO, la Figura 14 muestra un descenso en la producción de AH_2QDS a partir del día 75, que coincide con la época de invierno; no obstante, el desempeño del reactor se recuperó después de mantener la temperatura a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

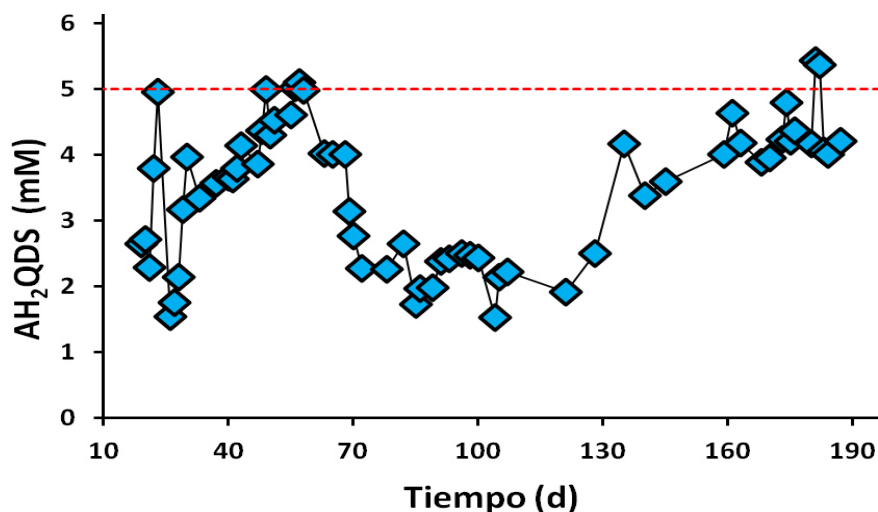


Figura 14. Desempeño del reactor con biomasa enriquecida con respecto a la formación de AH_2QDS durante la etapa del enriquecimiento.

7.3.2 Cinética de biotransformación de RC con lodo enriquecido

En la Figura 15a, se muestran los resultados de las cinéticas de biotransformación del RC con las biomasas enriquecida y control, ambas en ausencia de MR. La biomasa control alcanzó un 7% de decoloración, mientras que la biomasa enriquecida decoloró el 99.92% de RC después de 8 h de incubación. La incorporación de MR_{sol} mejoró las eficiencias de decoloración de ambas biomasas, alcanzándose valores de decoloración de 100% (a las 7 h) y 80.9% (a las 8 h) para las biomasas enriquecida y control, respectivamente (Figura 15b). No obstante, la adición de MR_{inm} durante la biotransformación reductiva del RC, también incrementó la eficiencia de decoloración, aunque en menor medida, con valores de 99.98 y 45.44% para la biomasa enriquecida y control, respectivamente (Figura 15c). Estos resultados claramente indican la

importancia de usar microorganismos especializados, así como el efecto de la adición de un MR durante el proceso, Sin embargo, como se discutió anteriormente, la adición continua de MR_{sol} durante los procesos de decoloración representa una desventaja ya que eleva los costos de operación. Para sobrellevar esta limitante, el uso de MR_{inm} resulta una opción sumamente atractiva, ya que se eliminan los costos extras por la adición recurrente del MR y las eficiencias de decoloración se mantienen elevadas con respecto los controles sin MR y con biomasas no enriquecidas.

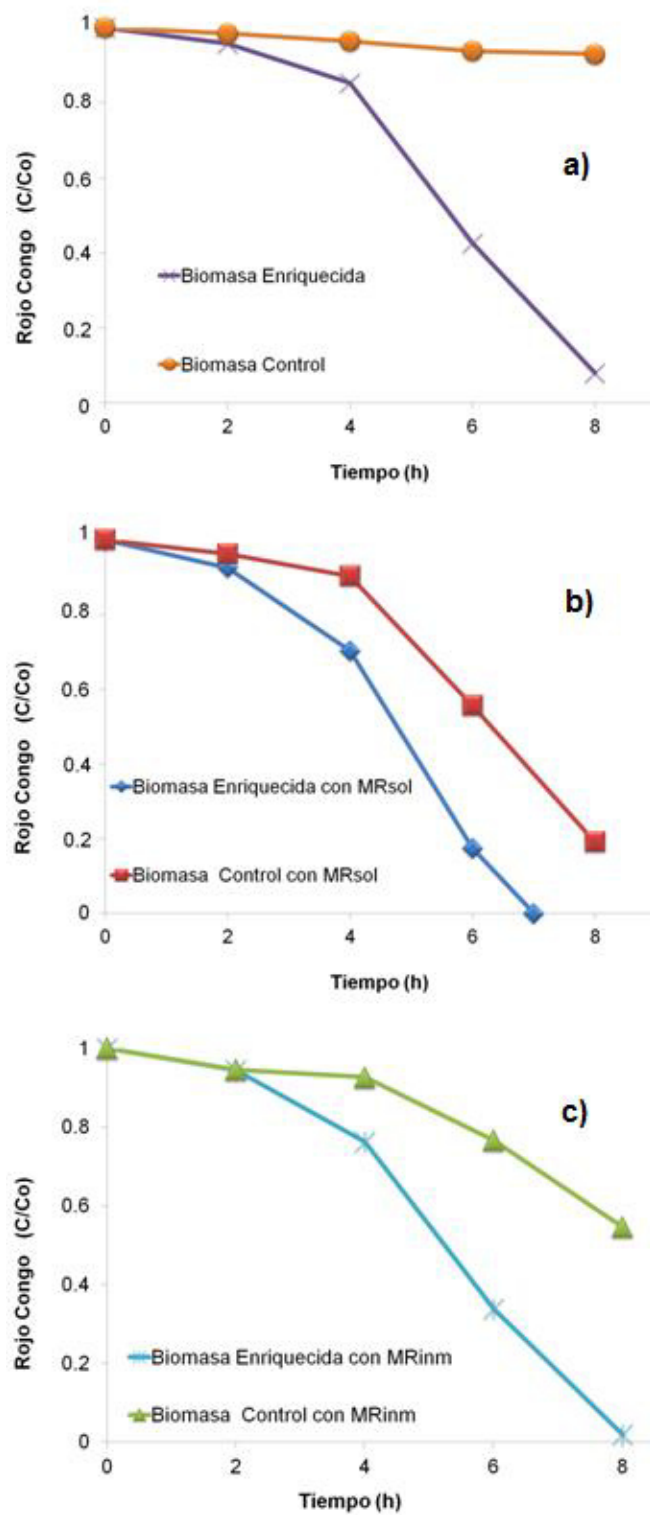


Figura 15. Cinéticas de biotransformación de RC. a) Biomosas enriquecida y biomasa control en ausencia de MR b) Biomosas enriquecida y biomasa control en presencia de MR_{sol} . c) Biomosas enriquecida y control en presencia de MR_{inm} .

Las tasas de decoloración 0.3845, 0.244, 0.1866, 0.1275, 0.0609 h⁻¹, obtenidas para los tratamientos de biomasa enriquecida con MR_{SOL}, biomasa enriquecida con MR_{INM}, biomasa enriquecida sin MR, biomasa control con MR_{SOL} y biomasa control con MR_{INM}, respectivamente, representan un incremento de entre 3.69 y 23.30 veces, con respecto a la tasa de decoloración de 0.0165 h⁻¹ obtenidas por la biomasa control en ausencia de MR (tabla 3). Estos resultados indican que el uso de una biomasa enriquecida, incluso en ausencia de MR representa una gran alternativa para el tratamiento de efluentes textiles. Sin embargo cabe mencionar que usando una biomasa enriquecida con MR_{INM} se incrementará la tasa de decoloración hasta 4.01 veces en comparación con solo la biomasa enriquecida.

Tabla 3. Tasas y porcentajes de decoloración de RC usando ambas biomasas con y sin MR

Biomasa	MR	kt (h ⁻¹)	Inc 1	Inc 2	% de remoción.
Enriquecida	MR _{SOL}	0.3845	23.30	3.02	100
	MR _{INM}	0.244	14.79	4.01	98.06
	Ausente	0.1866	11.31		99.92
Control	MR _{SOL}	0.1275	7.73		80.9
	MR _{INM}	0.0609	3.69		45.44
	Ausente	0.0165			7

*Inc1: incremento en la tasa de decoloración de todos los tratamientos con respecto a la biomasa control sin MR. Inc2: incremento en la tasa de decoloración de la biomasa enriquecida con MR_{SOL} y MR_{INM} con respecto a la biomasa enriquecida sin MR.

7.3.3 Actividad de reducción de quinonas

Los resultados de la cinética de reducción de quinonas se muestran en la Figura 16. Se observa un 95.22% de reducción de quinonas, obtenido por la biomasa enriquecida, comparado con el 23.89% obtenido por la biomasa control (a las 24 h). Estos resultados podrían indicar que efectivamente se han establecido especies microbianas capaces de reducir quinonas. Además coinciden con los resultados obtenidos por Cervantes *et al* (2003) quienes enriquecieron biomasa granular anaerobia y evaluaron su capacidad para

reducir quinonas, observando que ambas biomazas son capaces de reducir el AQDS. Sin embargo la biomasa control mostró una prolongada fase lag (3 días), mientras que la biomasa enriquecida redujo la quinona sin mostrar una fase lag. La ausencia de esta fase lag en la biomasa enriquecida, podría estar asociada a la presencia de especies de MRH que probablemente no se encuentren en las mismas proporciones que en la biomasa control. No obstante, es necesaria una identificación microbiana por técnicas de biología molecular para determinar que microorganismos son los que se han establecido en la biomasa enriquecida e intervienen en los procesos de reducción.

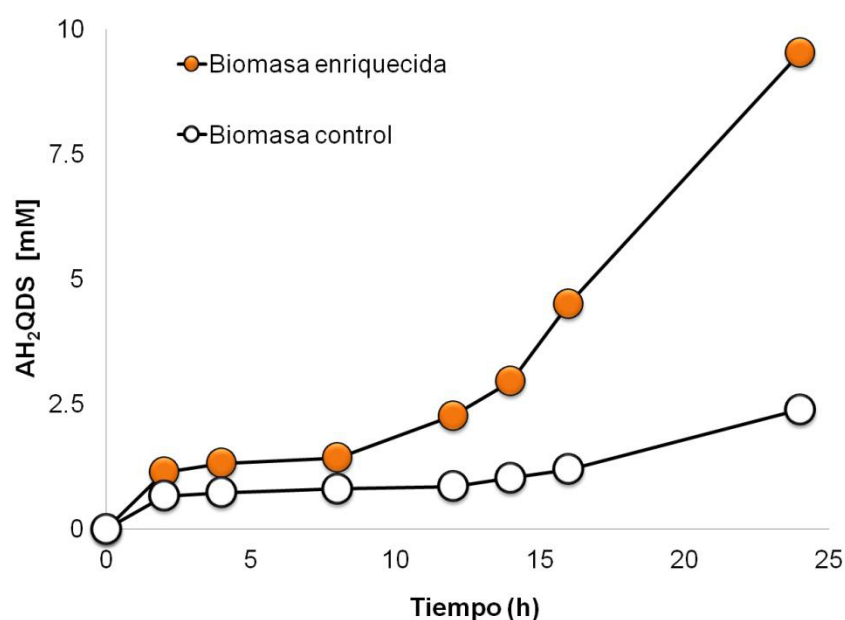


Figura 16. Cinética de reducción de quinonas con biomasa enriquecida y control.

8. CONCLUSIONES

- Luego de los 6 meses de enriquecimiento con AQDS como último aceptor de electrones, se obtuvo un consorcio enriquecido con MRH que fue capaz de reducir 3.98 veces más quinonas que el consorcio original.
- La incorporación del AQDS al CA incrementó 2.05 veces la CTE de material carbonáceo.
- El MR_{inm} no puede ser utilizado durante la biotransformación reductiva de todos los colorantes azo, ya que algunos de estos liberan aminas aromáticas con actividad auto-catalítica que pudieran actuar como MR durante el proceso y enmascarar el efecto real del MR en fase sólida.
- El CA modificado y no modificado con AQDS fue capaz de adsorber los productos de biotransformación AD71, limitando así el efecto autocatalítico de las aminas producidas.
- La biomasa enriquecida en presencia de MR_{inm} aumentó 14.79 veces la velocidad de decoloración del RC, con respecto al tratamiento control (biomasa no enriquecida en ausencia del MR) y, por lo tanto, el uso de biomasa enriquecida con MR_{inm} representa una valiosa alternativa para incrementar la velocidad de decoloración, reduciendo los tiempos de operación.

9. BIBLIOGRAFÍA.

1. Albuquerque, M.G.E., Lopes, A.T., Serralheiro, M.L., Novais, J.M., Pinheiro, H.M., (2005). Biological sulphate reduction and redox mediator effects on azo dye decolourisation in anaerobic–aerobic sequencing batch reactors. *Enzyme Microbiology. Technology.* 36, 790–799.
2. Alvarez, L.H., Valdez-Espinoza, R., García-Reyes, R.B., Olivo-Alanis, D., Garza-González, M.T., Meza-Escalante, E.R., Gortáres-Moroyoqui, P. (2015). Decolorization and biogas production by an anaerobic consortium: effect of different azo dyes and quinoid redox mediators. *Water Science & Technology*, 72 .
3. Baeta, B.E.L., Luna, H.J., Sanson, A.L., Silva, S.D.Q., Aquino, S.F.D. (2013). Degradation of a model azo dye in submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBR) operated with powdered activated carbon (PAC). *Journal of environmental management*, 128, 462-470.
4. Baêta, B.E.L., Ramos, R.L., Lima, D.R.S., Aquino, S.F., (2012). Use of submerged anaerobic membrane bioreactor (SAMBR) containing powdered activated carbon (PAC) for the treatment of textile effluents. *Water Science & Technology.* 65, 1540-1547.
5. Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchant, R., (1996). Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology.* 58, 217–227.
6. Ben, M., Schink, B., Brune, A., (1998). Humic acid reduction by *Propionibacterium freudenreichii* and other fermentative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4507–4512.
7. Brigé, A., Motte, B., Borloo, J., Buysschaert, G., Devreese, B., Van Beeumen, J.J., (2008). Bacterial decolorization of textile dyes is an extracellular process requiring a multicomponent electron transfer pathway. *Microbial Biotechnology* 1, 40-52.

8. Cervantes, F.J., Garcia-Espinosa, A., Moreno-Reynosa, M.A., Rangel-Mendez, J.R. (2010). Immobilized redox mediators on anion exchange resins and their role on the reductive decolorization of azo dyes. *Environmental science & technology*, 44, 1747-1753.
9. Cervantes, F., Duong-Dac, T., Roest, D.K., Akkermans, A., Lettinga, G., Field, J. (2003). Enrichment and immobilization of quinone-respiring bacteria in anaerobic granular sludge. *Water Science & Technology*, 48, 9-16.
10. Cervantes, F.J., Valenzuela, K.M.C., Ochoa, H.A.A., Díaz, F.S., Flores, E.R. (2011). Inmovilización de un mediador redox en carbón activado y su aplicación en la reducción biológica de colorantes azo..*AQM* 3,5
11. Cervantes, F.J., van der Velde, S., Lettinga, G., Field, J.A. (2000). Competition between methanogenesis and quinone respiration for ecologically important substrates in anaerobic consortia. *FEMS Microbiology Ecology*, 34, 161-171.
12. Cervantes, F.J., (2002). Quinones as Electron Acceptors and Redox Mediators for the Anaerobic Biotransformation of Priority Pollutants. *Agrotechnology and Food Sciences*, Sub-department of Environmental Technology, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands, p. 166.
13. Cervantes, F.J., Van Der Zee, F.P., Lettinga, G., Field, J.A., (2001). Enhanced decolourisation of acid orange 7 in a continuous UASB reactor with quinones as redox mediators. *Water Science & Technology*. 44, 123-128.
14. Chung, K.T., Stevens, S.E.J., (1993). Degradation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environmental. Toxicology. Chemistry*. 12, 2121–2132.

15. Coates, J.D., Bhupathiraju, V.K., Achenbach, L.A., McInerney, M.J., Lovley, D.R., (2001). *Geobacter hydrogenophilus*, *Geobacter chapellei* and *Geobacter grbicie*, three new strictly anaerobic dissimilatory Fe(III)-reducers. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology* 51, 581–588.
16. Coates, J.D., Ellis, D.J., Blunt-Harris, E.L., Gaw, C.V., Roden, E.E., Lovley, D.R., (1998)a. Recovery of humics-reducing bacteria from a diversity of sedimentary environments. *Applied and environmental Microbiology* 64, 1504–1509.
17. Costa, M.C., Mota, S., Nascimento, R.F.D., Dos Santos, A.B. (2010). Anthraquinone-2, 6-disulfonate (AQDS) as a catalyst to enhance the reductive decolourisation of the azo dyes Reactive Red 2 and Congo Red under anaerobic conditions. *Bioresource technology*, 101, 105-110.
18. Cripps C. Bumpus, J.A, Aust, S.D, (1990). Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 4: 1114- 1118.
19. Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., van Lier, J.B. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*, 98, 2369-2385
20. Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B., (2006). Potentials of high-temperature anaerobic treatment and redox mediators for the reductive decolorization of azo dyes from textile wastewaters. *Water Science & Technology*. 54, 151-156
21. Dos Santos, A.B., Cervantes, F.J., Yaya-Beas, R.E., Van Lier, J.B., 2003. Effect of redox mediator, AQDS, on the decolourisation of a reactive azo dye containing triazine group in a thermophilic anaerobic EGSB reactor. *Enzyme Microbiology. Technology*. 33, 942–951.

22. Dos Santos, A.B., Madrid, M.P., de Bok, F.A.M., Stams, A.J.M., Van Lier, J.B., Cervantes, F.J., 2006b. The contribution of fermentative bacteria and methanogenic archaea to azo dye reduction by thermophilic anaerobic consortium. *Enzyme Microbiology. Technology* 39, 38–46.
23. Dos Santos, A.B., Madrid, M.P., Stams, A.J.M., Van Lier, J.B., Cervantes, F.J., 2005b. Azo dye reduction by mesophilic and thermophilic anaerobic consortia. *Biotechnology. Progress.* 21, 1140–1145.
24. Dos Santos, A.B., Traverse, J., Cervantes, F.J., Van Lier, J.B., (2005a). Thermophilic treatment by anaerobic granular sludge as an effective approach to accelerate the electron transfer and improve the reductive decolorization of azo dyes in bioreactors.. *Water Science & Technology.* 52, 363-369.
25. Eaton, D., Chang, H.M., Kirk, T.K. (1980). Fungal decolorization of Kraft bleach plant effluent. *TAPPI-Journal of the Technical Association of the Pulp and Paper Industry* 63, 103-109.
26. Encinas Yocupicio, A.A., Razo-Flores, E., Sańchez Diaz, F., Dos Santos, A.B., Field, J.A., Cervantes, F.J., (2006). Catalytic effects of different redox mediators on the reductive decolorization of azo dyes. *Water Science & Technology.* 54, 165–170.
27. Fewson, C. A. (1988). Biodegradation of xenobiotic and other persistent compounds: the causes of recalcitrance. *Trends in Biotechnology.*, 6, 148-153.
28. Field, J.A., Brady, J., (2003). Riboflavin as a redox mediator accelerating the reduction of the azo dye Mordant yellow 10 by anaerobic granular sludge. *Water Science & Technology.* 48, 187-193.

29. Field, J.A., Cervantes, F.J., Van der Zee, F.P., Lettinga, G., (2000). Role of quinones in the biodegradation of priority pollutants: a review. *Water Science & Technology*. 42, 215-222.
30. Fukuzumi, T. (1980). Microbial decolorization and defoaming of pulping waste liquors in lignin biodegradation. In *Microbiology, Chemistry and Potential Applications*, Vol. 1, ed. T. K. Jurj, T. Higuchi & H. Chang. CRC Press, Boca Raton, FL, . 215-230.
31. Georgiou, D., Aivasidis, A., (2006). Decoloration of textile wastewater by means of a fluidized-bed loop reactor and immobilized anaerobic bacteria. *Journal of Hazardous Materials*. 135, 372-377.
32. Gujer, W., Zehnder, A.J.B., 1983. Conversion processes in anaerobic digestion. *Water Science & Technology*. 15, 127–167.
33. Guo, J., Zhou, J., Wang, D., Tian, C., Wang, P., Salah Uddin, M., (2007). Biocatalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salttolerant bacteria. *Water Research*; 41:426–32.
34. Haug, W., Schmidt, A., Nortemann, B., Hempel, D.C., Stolz, A., Knackmuss, H.J. (1991). Mineralization of the sulphonated azo dye mordant yellow 3 by a 6-aminonaphthalene- 2-sulphonate-degrading bacterium consortium. *Applied and Environmental Microbiology*., 57, 3144-3149.
35. Hong, Y., Gu, J.D. (2009). Bacterial anaerobic respiration and electron transfer relevant to the biotransformation of pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 973-980.
36. Hong, Y., Guo, J., Sun, G., (2008). Characteristic and phylogenetic analysis of facultative anaerobic dissimilatory azo-reducing bacteria from anaerobic activated sludge. *International Biodeterioration and Biodegradation* 61, 313–318.

37. Hong, Y., Xu, M., Guo, J., Xu, Z., Chen, X., Sun, G., (2007). Respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12 with an azo compound as sole electron acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 73, 64–72.
38. Horitsu, H., Takada, M., Idaka, E., Tomoyeda, M., Ogawa, T. (1977). Degradation of p-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis*. *European journal of applied microbiology and biotechnology.*, 4, 217-224.
39. Idaka, E., Ogawa, Y. (1978). Degradation of azo compounds by *Aeromonas hydrophila* var. 2413. *Journal of The Society of Dyers and Colourists.* 94, 91-94.
40. Hunger, K., Gregory, P., Miederer, P., Berneth, H., Heid, C., Mennicke, W., (2004). Important Chemical Chromophores of Dye Classes, first ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
41. Jing W., Lihua L., Jiti Z., Hong L., Guangfei L., Ruofei J., Fenglin Y. (2009) Enhanced biodecolorization of azo dyes by electropolymerization-immobilized redox mediator. *Journal of Hazardous Materials* 168, 1098-1104
42. Kalyuzhnyi, S., Sklyar, V., (2000). Biomineralisation of azo dyes and their breakdown products in anaerobic aerobic hybrid and UASB reactors. *Water Science & Technology.* 41, 23-30.
43. Knapp, J.S., Newby, P.S. (1995). The microbiological decolorization of an industrial effluent containing a diazo-linked chromophore. *Water Research.*, 29, 1807-1809.
44. Kumar, P., Prasad, B., Mishra, I.M., Chand, S., (2008). Treatment of composite wastewater of a cotton textile mill by thermolysis and coagulation. *Journal of Hazardous Materials.*, 151, 770-779.

45. Laszlo, J.A., (2000). Regeneration of azo-dye-saturated cellulosic anion exchange resin by *Burholderia cepacia* anaerobic dye reduction. *Environmental Science & Technology*. 34, 164–172.
46. Lourenco, N.D., Novais, J.M., Pinheiro, H.M., (2000). Reactive textile dye colour removal in a sequencing batch reactor. *Water Science & Technology*. 42: 321–328.
47. Lovley, D.R., Coates, J.D., Blunt-Harris, E.L., Phillips, E.J.P., Woodward, J.C., (1996). Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382, 445–448.
48. Lovley, D.R., Fraga, J.L., Blunt-Harris, E.L., Hayes, L.A., Phillips, E.J.P., Coates, J.D., (1998). Humic substances as a mediator for microbially catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 26, 152–157.
49. Lovley, D.R., Kashefi, K., Vargas, M., Tor, J.M., Blunt-Harris, E.L., (2000). Reduction of humic substances and Fe(III) by hyperthermophilic microorganisms. *Chemical Geology* 169, 289–298.
50. Macalady DL, Walton-Day K (2011). Redox chemistry and natural organic matter (NOM): Geochemists' dream, analytical chemists' nightmare. In: Tratnyek PG, Grundl TJ, Haderlein SB (eds) Aquatic redox chemistry. *American Chemical Society*, Washington, DC, pp 85-111.
51. Martinez, C.M., Alvarez, L.H., Celis, L.B., Cervantes, F.J. (2013). Humus-reducing microorganisms and their valuable contribution in environmental processes. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 10293-10308.
52. Mattson, J.A., Mark, H.B., Malbin, M.D., Weber, W.J., Crittenden, J.C. (1969). Surface chemistry of active carbon: specific adsorption of phenols. *Journal of Colloid and Interface Science*, 31, 116-130.

53. Méndez-Paz, D., Omil, F., Lema, J.M., (2005). Anaerobic treatment of azo dye acid orange 7 under fed-batch and continuous conditions. *Water Research*,. 39, 771-778.
54. Mezohegyi, G., Bengoa, C., Stuber, F., Font, J., Fabregat, A., Fortuny, A. (2008). Novel bioreactor design for decolourisation of azo dye effluents. *Chemical Engineering Journal*, 143, 293-298.
55. Mezohegyi, G., Kolodkin, A., Castro, U.I., Bengoa, C., Stuber, F., Font J., Fabregat, A. (2007). Effective Anaerobic Decolorization of Azo Dye Acid Orange 7 in Continuous Upflow Packed-Bed Reactor Using Biological Activated Carbon System. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 46, 6788-6792.
56. Michel Jr, F.C., Dass, S.B., Grulke, E.A., Reddy, C.A. (1991). Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2368-2375.
57. Moreno-Castilla, C. (2004). Adsorption of organic molecules from aqueous solutions on carbon materials. *Carbon*, 42, 83-94.
58. Nigam, P., Banat, I.M., Singh, D., Marchant, R. (1996). Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process biochemistry*, 31, 435-442.
59. Olivo Alanís, D. (2015). Immobilization of redox mediator for anaerobic biotransformation of congo red dye. Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
60. O'Neill, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenc-o, N.D., Pinheiro, H.M., Dele' e, W., (1999). Colour in textile effluents—sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 74, 1009–1018.

61. O'Neill, C., Lopez, A., Esteves, S., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Wilcox, S. (2000). Azo-dye degradation in an anaerobic-aerobic treatment system operating on simulated textile effluent. *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 249-254.
62. Panswad, T., Luangdilok, W., (2000). Decolorization of reactive dyes with different molecular structures under different environmental conditions. *Water Research*, 34, 4177–4184.
63. Pasti-Grigsby M.B, Paszczynski A, Goszynski, S, Crawford D.L. y Crawford, R.L. (1992). Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 3605-3613.
64. Pearce, C.I., Lloyd, J.R., Guthrie, J.T. (2003). The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and pigments*, 58, 179-196.
65. Pearce, C.I., Christie, R., Boothman, C., Von Canstein, H., Guthrie, J.T., Lloyd, J.R., 2006. Reactive azo dye reduction by *Shewanella* Strain J18 143. *Biotechnology and Bioengineering*, 95, 692–703.
66. Poots, V.J., McKay, G., Heakt, J.J. (1976). The removal of acid dye from effluent using natural absorbents--11. *Water Research*, 10, 1067-1070.
67. Rau, J., Knackmuss, H.J., Stolz, A., (2002). Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria. *Environmental Science & Technology*, 36, 1497–1504.
68. Rios-Del Toro, E. E., Celis, L. B., Cervantes, F. J., Rangel-Mendez, J. R. (2013). Enhanced microbial decolorization of methyl red with oxidized carbon fiber as redox mediator. *Journal of hazardous materials*, 260, 967-974.

69. Robinson, T., McMullan, G., Marchant R., Nigam P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*, 77, 247-255.
70. Schink, B., 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 262–280.
71. Schink, B., 2002. Anaerobic digestion: concepts, limits and perspectives. *Water Science & Technology*, 45, 1–8.
72. Semde, R., Pierre, D., Geuskens, G., Devleeschouwer, M., Moes, A.J. (1998). Study of some important factors involved in azo derivative reduction by *Clostridium perfringens*. *International journal of pharmaceutics*, 161, 45-54.
73. Seshadri, S., Bishop, P.L., Agha, A.M. (1994). Anaerobic/aerobic treatment of selected azo dyes in wastewater. *Waste Management*, 15, 127-137.
74. Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied microbiology and biotechnology*, 56, 69-80.
75. Supaka, N., Juntongjin, K., Damronglerd, S., Delia, M.L., Strehaiano, P. (2004). Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic–aerobic system. *Chemical Engineering Journal*, 99, 169-176.
76. Tan, N.C.G., Opsteeg, J.L., Lettinga, G., Field, J.A., 1999. Mineralization of azo dyes under integrated anaerobic/aerobic conditions. In: Fass et al. (Eds.), *Novel Approaches for Bioremediation of Organic Pollution*. Kluwer academic/Plenum Publishers, New York, pp. 83–93.
77. Turick, C.E., Tisa, L.S., Caccavo, F., Jr (2002) Melanin production and use as a soluble electron shuttle for Fe(III) oxide reduction and as a

terminal electron acceptor by *Shewanella* algae BrY. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2436– 2444.

78. Van der Zee, F.P., Cervantes, F.J. (2009). Impact and application of electron shuttles on the redox (bio) transformation of contaminants: a review. *Biotechnology advances*, 27, 256-277.
79. Van der Zee, F.P., Bisschops, I.A.E., Blanchard, V.G., Bouwman, R.H.M., Lettinga, G., Field, J.A., (2003). The contribution of biotic and abiotic processes during azo dye reduction in anaerobic sludge. *Water Research*, 37, 3098- 3109.
80. Wang, X., Cheng, X., Sun, D. (2008). Autocatalysis in Reactive Black 5 biodecolorization by *Rhodopseudomonas palustris* W1. *Applied microbiology and biotechnology*, 80, 907-915.
81. Watanabe K y Baker PW (2000). Environmentally relevant microorganisms. *J. Bioscience and Bioengineering*. 89: 1–11.
82. Weisburger, J.H., (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research*, 506-507, 9-20.
83. Wuhrmann, K., Mechsner, K.L., & Kappeler, T.H. (1980). Investigation on rate—Determining factors in the microbial reduction of azo dyes. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 9, 325-338.

ANEXOS

I. Obtención de productos autocatalíticos derivados de la biotransformación reductiva de AD71.

Con el objetivo de comprobar la existencia de un efecto (auto)catalítico, atribuido a los productos de biotransformación (PB), se procedió a decolorar el AD71 en botellas serológicas utilizando lodo anaerobio, para obtener las aminas aromáticas. Una vez decolorada la solución, los PB se sometieron a experimentos de adsorción en CA con el fin de tener un panorama más amplio y claro del comportamiento de las cinéticas de biotransformación del AD71 en presencia del MR_{inm} (CA-AQDS) mostradas en la Figura 12. Las condiciones para la obtener los PB fueron las mismas usadas para la cinéticas, sólo que en ausencia de MR. Se utilizaron botellas serológicas con capacidad de 100 mL, a las que se agregaron 29 mL del medio basal y 0.1 g SSV/L. Una vez inoculadas las botellas, se sellaron con tapones de caucho y anillos de aluminio. Para crear condiciones anaerobias en los cultivos se intercambié la atmósfera de las botellas pasando una mezcla de N_2/CO_2 (80%/20%) durante 5 minutos. Una vez que se alcanzaron condiciones anaerobias, se agregaron 1 g/L de acetato como sustrato y donador de electrones, y 150 mg/L del colorante AD71. El acetato y el colorante se agregaron a partir de soluciones stock previamente preparadas. Las botellas se incubaron a 30°C y 150 rpm hasta que se observó la decoloración total. El experimento se realizó por triplicado para obtener suficientes PB que serán requeridos en posteriores experimentos.

II. Experimentos de adsorción de PB en CA.

Paralelamente a la decoloración se preparó una botella serológica con capacidad de 100 mL, a la que se agregaron 132 mg de CA, equivalentes a la cantidad de CA utilizados en las cinéticas de decoloración con MR_{inm} . Se intercambié la atmosfera con una mezcla de N_2/CO_2 (80%/20%) para asegurar condiciones anaerobias. Una vez que se alcanzó la decoloración total del AD71, se uso una jeringa de 50 mL para transferir la solución con los PB (a

través de un filtro de 0.25 μm) a la botella con el CA. Se tomó una alícuota de 3 mL y se diluyó en buffer de fosfatos para obtener un factor de dilución de 30, y posteriormente realizar un barrido espectrofotométrico inicial (a las 0 h de adsorción). La botella con el CA y los PB se mantuvo a 30°C y una agitación constante de 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 3 mL a las 2, 5 y 30 h para monitorear adsorción de los PB en el CA.

III. Resultados de los experimentos de adsorción de PB en CA

En la Figura 17 se presentan los barridos espectrofotométricos realizados durante los experimentos de adsorción del AD71 y sus PB en CA, a las 0, 2, 5 y 30 h. Una vez que se ha alcanzado la decoloración total, se aprecia la formación de 4 picos, sugiriendo que los 3 enlaces azo del AD71 han sido reducidos y que se han liberando los PB. Además, se observa como la intensidad de señal producida por cada uno de los PB decrece a través del tiempo, hecho que podría atribuirse a un posible fenómeno de adsorción en el CA. Los resultados de la cinética de biotransformación (Figura 12) y de la adsorción en CA de los PB indican que la amina con capacidad (auto)catalítica participa como MR, pero también es susceptible a adsorberse y perder en gran medida su capacidad de actuar como MR. No obstante, se requieren futuros experimentos para identificar y aislar el PB de interés que posee esa capacidad (auto)catalítica, ya que los PB también podrían ser usados como MR durante la biotransformación reductiva de colorantes azo.

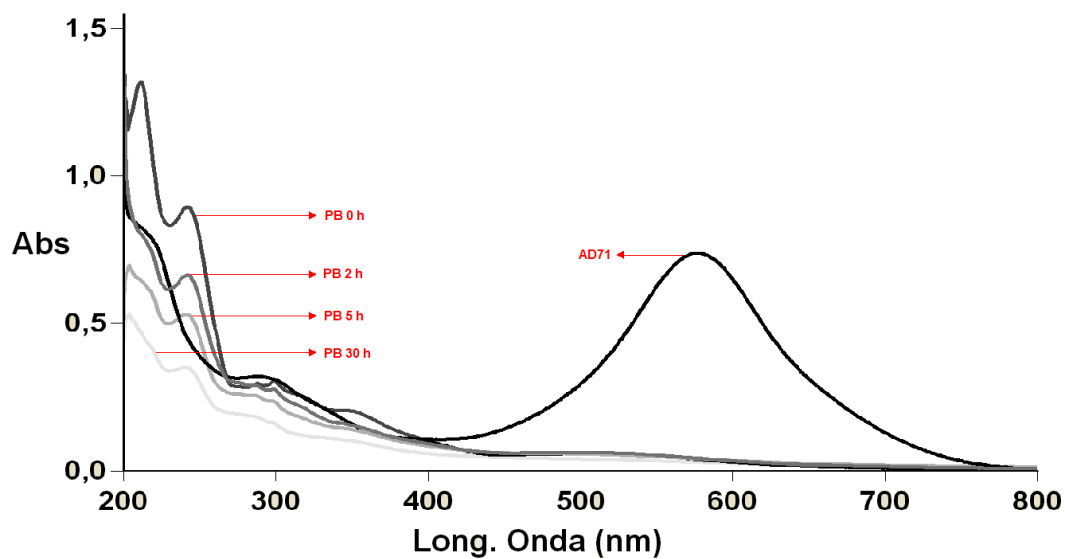


Figura 17. Adsorción de PB del AD71 en CA.

IV. Caracterización del CA

Tabla 4. Sitios ácidos y básicos por gramo de CA. (Olivo, 2015)

Masa (g)	Carboxílicos (mEq/g)	Lactónicos (mEq/g)	Fenólicos (mEq/g)	Sitios ácidos totales (mEq/g)	Sitios básicos totales (mEq/g)
0.1	1.7	0.25	0.42	2.43	0.01
0.2	1.8	0.28	0.56	2.62	0.03
0.3	1.75	0.22	0.52	2.45	0.05
$\mu \pm \sigma$	1.75 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.50 ± 0.07	2.50 ± 0.10	0.03 ± 0.02